

**Fluoreszenz- und streuungsbasierte Einzelmolekülmikroskopie an DNA-Origami-Nanostrukturen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Bettina Wünsch

aus Goslar

1. Referent: Professor Dr. Philip Tinnefeld

2. Referent: Privatdozent Dr. Christof Maul

eingereicht am: 13.09.2017

mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.10.2017

Druckjahr: 2018

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

A. Puchkova, C. Vietz, E. Pibiri, **B. Wunsch**, M. Sanz Paz, G. P. Acuna, P. Tinnefeld: *DNA Origami Nanoantennas with over 5000fold Fluorescence Enhancement and Single-Molecule Detection at 25  $\mu$ M*. Nano Letters, 2015, 15(12), p. 8354-8359.

E. A. Hemmig, C. Creatore, **B. Wunsch**, L. Hecker, P. Mair, M. A. Parker, S. Emmott, P. Tinnefeld, U. F. Keyser, and A. W. Chin: *Programming light-harvesting efficiency using DNA origami*. Nano Letters, 2016, 16, 4, p. 2369-2374.

P.C. Nickels, **B. Wunsch**, P. Holzmeister, W. Bae, L.M. Kneer, D. Grohmann, P. Tinnefeld, T. Liedl: *Molecular Force Spectroscopy with a DNA Origami Based Nanoscopic Force Clamp*. Science, 2016, 354 (6310), p. 305-307.

**B. Wunsch**, P.C. Nickels, T. Schröder, D. Grohmann, T. Liedl, P. Tinnefeld: *Molekulare Kraftklammer, Kraftspektroskopie leichtgemacht*. GIT Laborfachzeitschrift, Januar 2017.

**Tagungsbeiträge**

**B. Wunsch**, P. Holzmeister, A. Gietl, P. Tinnefeld, "Photophysics of nonfluorescent single-molecule FRET acceptors" (Poster), 19<sup>th</sup> International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences, 04.09.-06.09.2013, Berlin.

**B. Wunsch**, P. Holzmeister, A. Gietl, P. Tinnefeld, "Studying the photophysical behavior of nonfluorescent FRET acceptors on the single-molecule level" (Poster), 5. Braunschweiger Jungchemiker Tagung, 15.04.2014, Braunschweig.

**B. Wunsch**, C. Vietz, P. Holzmeister, A. Puchkova, G. Acuna, P. Tinnefeld, "Studying the interaction between metallic nanostructures and fluorescent dyes with a combined single-molecule fluorescence and dark field microscope" (Poster), 20th International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences, 02.09.-05.09.2014, Berlin.

**B. Wunsch**, C. Vietz, P. Holzmeister, A. Puchkova, G. Acuna, P. Tinnefeld, "Studying the interaction between metallic nanostructures and fluorescent dyes" (Poster), Summer School of Metrology, 13.10.-15.10.2015, Drübeck.

**B. Wunsch**, P. Holzmeister, C. Vietz, A. Puchkova, G. Acuna, P. Tinnefeld "Single-molecule-study of interactions between gold nanostructures and fluorescent dyes on DNA origami" (Poster), Single-Molecule Microscopy and Spectroscopy Faraday Discussion, 14.09.-16.09.2015, London.

**B. Wunsch**, E. Hemming, P. Nickels, P. Holzmeister, E. Pibiri, C. Vietz, G. Acuna, U. Keyser, T. Liedl, P. Tinnefeld "Single-Molecule Spectroscopy using DNA origami" (Vortrag), Statusseminar Metrology for Complex Nanosystems - NanoMet, 30.03.-01.04.2016, Sankt Andreasberg.

**B. Wunsch**, K. Hübner, E. Pibiri, G. Acuna, P. Tinnefeld, "Estimating the influencing effects on DNA origami nanolenses" (Poster), Summer School on Nanometrology, 10.08.-12.08.2016, Drübeck.



## Inhalt

Vorveröffentlichungen der Dissertation .....	1
Inhalt .....	3
Kurzfassung .....	6
Abstract .....	7
1. Einleitung .....	8
1.1. DNA-Origami basierte molekulare Kraftklammer .....	8
1.2. DNA-Origami basierter Lichtsammelkomplex .....	10
1.3. DNA-Origami basierte Nanoantennen .....	11
2. Theoretische Grundlagen .....	15
2.1. Photophysik organischer Farbstoffmoleküle .....	15
2.1.1. Photostabilisierung von Farbstoffmolekülen .....	17
2.1.2. Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) .....	18
2.2. Plasmonen in metallischen Nanopartikeln .....	20
2.2.1. Lokalisierte Oberflächenplasmonen .....	20
2.2.2. Absorption und Streuung – Rayleigh-Theorie .....	23
2.2.3. Optische Eigenschaften - Mie-Theorie .....	25
2.2.4. Wechselwirkung zwischen zwei metallischen Nanopartikeln .....	27
2.2.5. Wechselwirkung zwischen Licht, metallischen Nanopartikeln und Farbstoffmolekülen .....	27
2.3. Biologische Grundlagen .....	32
2.3.1. DNA .....	32
2.3.2. Holliday Junction .....	34
2.3.3. DNA-Origami .....	34
2.3.4. Archaeelles TATA-Box-bindendes Protein .....	36
3. Material und Methoden .....	37
3.1. Mikroskop-Aufbau .....	37
3.1.1. Das kombinierte Fluoreszenzmikroskop .....	37
3.1.2. Das Fluoreszenzmikroskop für FRET-Messungen .....	40
3.2. Auswertung .....	41
3.2.1. Zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung .....	41

3.2.2.	Alternierende Laseranregung ALEX / FRET Auswertung .....	42
3.2.3.	Dunkelfeldmikroskopie Auswertung .....	48
3.2.4.	Auswertung der kombinierten Dunkelfeld- und Fluoreszenzmessung .....	50
3.3.	Probenvorbereitung .....	53
3.3.1.	Herstellung der DNA-Origami-Strukturen .....	53
3.3.2.	Funktionalisierung von metallischen Nanopartikeln .....	54
3.3.3.	Oberflächenvorbereitung .....	55
3.3.4.	Lösungssynthese .....	57
3.3.5.	Photostabilisierung von Farbstoffmolekülen .....	58
4.	Ergebnisse und Diskussion .....	59
4.1.	DNA-Origami basierte molekulare Kraftklammer .....	59
4.1.1.	Das Modell der frei beweglichen Kette .....	60
4.1.2.	Holliday Junction .....	61
4.1.3.	TATA-Box bindendes Protein .....	65
4.2.	DNA-Origami Lichtsammelkomplex .....	69
4.3.	Kombinierte Dunkelfeld-Fluoreszenz-Messungen .....	73
4.3.1.	Überprüfung des Dunkelfeld-Mikroskops .....	73
4.3.2.	Die DNA-Origami Nanoantenne .....	75
4.3.2.1.	Das Monomer .....	77
4.3.2.2.	Das Dimer .....	83
4.3.2.3.	Abweichungen .....	89
4.3.2.4.	Wachstum der Gold-Nanopartikel an der DNA-Origami Nanoantenne .....	91
4.3.2.5.	Das rechteckige DNA-Origami als Nanoantenne .....	93
5.	Zusammenfassung und Ausblick .....	100
5.1.	DNA-Origami basierte molekulare Kraftklammer .....	100
5.2.	DNA-Origami Lichtsammelkomplex .....	100
5.3.	DNA-Origami Nanoantennen .....	101
6.	Anhang .....	103
6.1.	LabVIEW Programme .....	103
6.2.	Filter und Spiegel .....	107
6.3.	Chemikalienliste .....	108

6.4.	Puffer.....	109
6.5.	DNA-Origami Rezept für das modifizierte rechteckige DNA-Origami.....	110
6.6.	Gele.....	115
6.7.	Daten.....	116
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	135
8.	Literaturverzeichnis.....	136
9.	Abbildungsverzeichnis.....	141
10.	Tabellenverzeichnis.....	156
11.	Liste aller Publikationen.....	157
12.	Danksagung.....	158
13.	Curriculum Vitae.....	159

## Kurzfassung

Seit der Einführung der DNA-Origami-Technik im Jahr 2006 durch Paul Rothemund ist es möglich, dreidimensionale Nanostrukturen durch eine einfache Bottom-up-Synthese herzustellen. Diese erlauben aufgrund ihrer Beschaffenheit eine exakte Positionierung von Biomolekülen und Farbstoffmolekülen im einstelligen Nanometerbereich.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Tim Liedl an der LMU München konnte auf diese Weise eine molekulare Kraftklammer entwickelt werden, bei der über Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energie-Transfer die zwischen Biomolekülen wirkenden Kräfte ausgelesen werden. Zunächst wurde die Holliday Junction, ein gut studiertes Biomolekül, auf sein Verhalten unter kontrollierter Krafteinwirkung hin untersucht und mit kraftspektroskopischen Messungen der Arbeitsgruppe von T. J. Ha verglichen. Durch die gezeigte Übereinstimmung der Messergebnisse wurde nachgewiesen, dass die molekulare Kraftklammer aufgrund ihrer Robustheit ein geeignetes System ist, Kräfte im niedrigen Piconewton Bereich zu messen. Um die Anwendbarkeit für die Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen zu zeigen, wurde anschließend das TATA-Box-bindende Protein (TBP) auf die Kraftabhängigkeit beim Binden und Knicken von DNA geprüft. Schließlich konnte so im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die neue molekulare Kraftklammer das bestehende Feld der Kraftspektroskopie erweitert und die Untersuchung jeglicher Systeme ermöglicht, die mit DNA wechselwirken oder selbst durch DNA modifizierbar sind.

Der FRET ist jedoch nicht nur ein Werkzeug zur Untersuchung von abstandsabhängigen Interaktionen, sondern tritt auch in der Natur in Lichtsammelkomplexen (LSK) auf. Diese bestehen aus mehreren Donormolekülen, die das Sonnenlicht einsammeln und mittels FRET auf einen Akzeptor übertragen. Um zu ermitteln wie effizient ein solches System ist, habe ich in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von U. Keyser von der University of Cambridge synthetische LSKs basierend auf der DNA-Origami-Technik auf ihren Antenneneffekt hin untersucht. Anhand von Einzelmolekül-FRET-Messungen konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Proben sehr homogen und robust sind und sich die DNA-Nanostruktur als Gerüst für die Entwicklung von Lichtsammelkomplexen eignet. Die maximale Verstärkung des Antenneneffekts lag nur bei einem Faktor fünf, da dieser durch die maximal einsetzbare Anzahl an Donormolekülen und deren Wechselwirkungen miteinander (ineffizienter Donor-Donor-Transfer, Donor-Donor-Löschung) limitiert ist.

Für die Einzelmoleküldetektion von organischen Farbstoffen werden hohe Laserleistungen von mehreren hundert bis tausend Watt pro Quadratzentimeter benötigt. Um diese Technik für ein breiteres Anwendungsgebiet (z.B. High-Throughput-Screening und molekulare Diagnostik) nutzbar zu machen, muss eine Verstärkung der Anregungs- und Emissionsrate der Farbstoffmoleküle um zwei bis drei Größenordnungen erreicht werden. Da die Anzahl der Photonen, die durch ein organisches Farbstoffmolekül absorbiert und emittiert werden können, begrenzt ist, wurden als Alternative zu Donor-Akzeptor-Paaren metallische Nanopartikel (vorwiegend aus Gold und Silber) eingesetzt. Diese haben einen bis zu fünf Größenordnungen höheren Absorptions- und Streuungsquerschnitt und sind in der Lage die Anregungs- und Emissionsrate von Farbstoffmolekülen zu verstärken. Aufbauend auf diesem Wissen wurden in den letzten Jahren neuartige Nanoantennen auf Basis der DNA-Origami-Technik entwickelt, die Fluoreszenzverstärkungen bis zu einem Faktor von 5000 ermöglichen. Für ihre Weiterentwicklung und insbesondere für ihren Einsatz in diagnostischen Experimenten ist es nötig ihre Heterogenität besser zu verstehen. Daher habe ich die optischen Eigenschaften einer Nanoantenne, bestehend aus einem Farbstoffmolekül in dem „Hot Spot“ von einem bzw. zwei metallischen Nanopartikeln an einem DNA-Origami untersucht. Im Mittelpunkt der Arbeit steht der Vergleich zwischen den optischen Eigenschaften des metallischen Nanopartikels mit denen des Farbstoffmoleküls für unterschiedliche Nanopartikelgrößen und -materialien, sowie zweier verschiedener DNA-Origami-Strukturen. Zum ersten Mal konnten so in dieser Arbeit die Fluoreszenzeigenschaften einzelner Nanoantennen aus DNA-Origami direkt Streuungsspektren der zugehörigen metallischen Nanopartikel auf Einzelmolekülebene zugeordnet werden. Mit dieser Methode wird es in Zukunft möglich sein, Nanoantennen aus DNA-Origamis zu entwickeln, die ausreichend homogen und reproduzierbar sind, um beispielsweise in der molekularen Diagnostik oder der DNA-Sequenzierung Anwendung zu finden.

## Abstract

Since the DNA origami technique was introduced in 2006 by Paul Rothemund, three dimensional nanostructures can be assembled via bottom-up synthesis. Due to their composition, the exact positioning of biomolecules and dyes in the range of a few nanometres is possible.

Together with the working group of Tim Liedl from the LMU München, we developed a molecular force clamp which is used for the readout of forces that exist between biomolecules via single-molecule Förster resonance energy transfer. First, the properties of the Holliday Junction, a well-studied biomolecule, was tested with respect to the amount of applied force. By comparing the results obtained with force spectroscopic measurements by the working group of T. J. Ha, it was demonstrated that, due to its robustness, the molecular force clamp is a system which is suitable for the measurement of forces of a few piconewton. To show the applicability for the investigation of protein-DNA interactions, the force dependence of the TATA-binding protein (TBP) during bending of the DNA was examined. Finally, it was highlighted that the new molecular force clamp expands the field of force spectroscopy and enables the study of every system that interacts with DNA or can be modified with DNA.

FRET is not only a tool to study distance dependent interactions but also it is present in natural light harvesting complexes (LHC). These consist of multiple donor molecules that collect sun light and transfer the energy to an acceptor via FRET. To determine the efficiency of such a system, I studied the antenna effect of synthetic LHCs based on the DNA origami technique together with the working group of U. Keyser from the University of Cambridge. With single-molecule FRET measurements, it was possible to show that the synthesized samples are very homogenous and further that the DNA nanostructures are suitable as a platform for the development of LHCs. The maximum enhancement of the antenna effect achieved was only five-fold due to the maximum number of donor molecules applicable and the interactions between them (inefficient donor-donor-transfer, donor-donor-quenching).

In single-molecule detection of organic dyes high laser powers on the order of hundreds to thousands of Watt per square centimetres are required. To make this technique more favourable for use in a wider range of applications (like high throughput screening, molecular diagnostics), an enhancement of the excitation- and emission rate of the dyes on the order of two to three orders of magnitude is necessary. Since the amount of photons that can be absorbed and emitted by an organic dye is limited, metallic nanoparticles (mostly gold and silver) were introduced as an alternative to donor-acceptor pairs. These have the advantage that they have an absorption- and scattering cross-section which is up to five orders of magnitude higher and they are able to enhance the excitation- and emission rate of dyes. Based on this knowledge, new nanoantennas were developed based on the DNA origami technique that can enhance the fluorescence by a factor of up to 5000. For further development and in particular for their use in diagnostic experiments, it is necessary to understand their heterogeneity. Therefore, I studied the optical properties of a nanoantenna made of a dye in the hot spot of one or two metallic nanoparticles that are immobilised on a DNA origami. The main part of this work focuses on the comparison between the optical properties of the metallic nanoparticles and the dye for different sizes and materials of the nanoparticles as well as on two different DNA origami structures. For the first time, it was possible to correlate the fluorescence properties of single nanoantennas based on DNA origami with the scattering spectra of the corresponding metallic nanoparticles at the single-molecule level. With this method it will be possible to develop nanoantennas based on DNA origami with sufficient homogeneity and reproducibility to use them in molecular diagnostic or DNA sequencing.

## 1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist die Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie (EMFM) zu einem wichtigen Forschungsfeld geworden, das besonders für die Nanobiotechnologie großen Fortschritt bedeutet. Der Vorteil der EMFM ist, dass nicht wie bei Messungen mit einem Fluoreszenzspektrometer das gemittelte Signal einer Probe erhalten wird, sondern jedes Molekül einzeln betrachtet wird. So können die Moleküle auf Grundlage ihrer Fluoreszenzeigenschaften (Spektrum, Fluoreszenzlebensdauer, usw.) sortiert werden und Moleküle, die in der Probe eine Minderheit darstellen und durch Mittelung im Fluoreszenzspektrometer im Hintergrundsignal untergegangen wären, analysiert werden. Somit besteht nun die Möglichkeit Proben zu messen, die nicht absolut rein sind, da die Hintergrundmoleküle aussortiert werden können und nur die interessanten Moleküle betrachtet werden. Zusätzlich ist es möglich, nicht nur eine Probe in ihre unterschiedlichen Moleküle zu unterteilen (statische Heterogenität), sondern auch Moleküle zu beobachten, die ihre Eigenschaften über die Zeit verändern (dynamische Heterogenität). Im ersten Teil der Arbeit wird eine kraftspektroskopische Untersuchung der Konformationsänderung der Holliday Junction [1] und des Anbindens des TATA-Box-bindenden Proteins (TBP) an DNA [2] mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfer durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein DNA-Origami entwickelt, das als Werkzeug zum Messen der Kraftabhängigkeit der Interaktionen zwischen Biomolekülen dient. Im zweiten Teil der Arbeit wird der Antenneneffekt, der in der Natur in Lichtsammelkomplexen auftritt, mittels FRET-Mikroskopie und Verwenden der DNA-Origami-Technik untersucht. Der letzte Teil der Arbeit befasst sich schließlich mit den plasmonischen Effekten, die bei einer Nanoantenne aus einem Farbstoff und einem oder zwei metallischen Nanopartikeln verbunden über ein DNA-Origami auftreten.

### 1.1. DNA-Origami basierte molekulare Kraftklammer

Damit ein Protein an DNA anbinden und diese knicken kann, muss es seine Konformation und/oder die des Zielmoleküls verändern. Dabei müssen Kräfte aufgewandt werden, deren Größe zu bestimmen ein wichtiger Teilschritt ist, um Interaktionen zwischen Molekülen vorhersagen zu können. Die gängigsten Methoden der Kraftspektroskopie sind die Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) und die optische bzw. magnetische Pinzette (*optical/magnetical tweezer*). Diese drei Techniken haben die Gemeinsamkeit, dass bei ihnen das zu untersuchende Molekül mit einem Ende auf einem Substrat immobilisiert wird und das andere Ende an eine Messsonde angebunden wird durch die die Kraft ausgeübt wird (siehe Abbildung 1A und B).

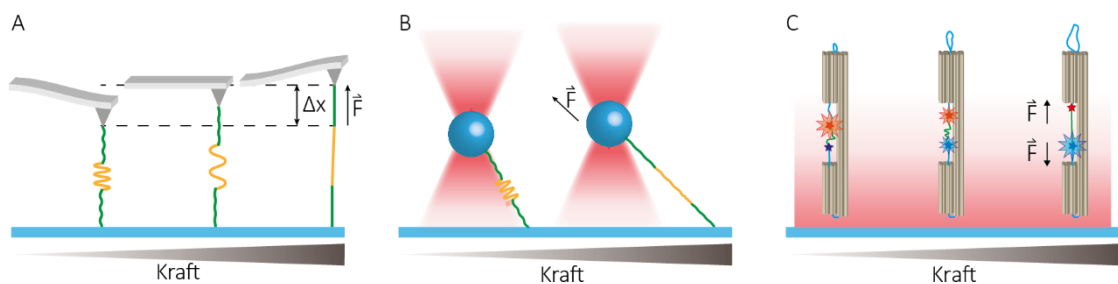


Abbildung 1: Schematische Darstellung der A) Kraftspektroskopie, B) optischen Pinzette und C) molekularen Kraftklammer (verändert nach [3]).

Die AFM Spitze wird mechanisch aus ihrer Ruheposition ausgelenkt und übt so eine Zugkraft auf das eingespannte Molekül aus. Bei der optischen Pinzette hingegen wird eine dielektrische Kugel durch Bewegen eines Laserstrahls in der Probe bewegt. In beiden Fällen führt die Krafteinwirkung auf das Molekül zu einer Streckung desselben. Durch Auftragen der gemessenen Kraft gegen die Abstandsänderung können Informationen über das Kraft-Verhalten der Probe erhalten werden. Beispielsweise wurde so DNA auf ihre Elastizität untersucht [4] und das Entfalten von Proteinen beobachtet [5]. Der Vorteil der optischen Pinzette gegenüber dem AFM ist, dass ein kleinerer Kraftbereich zugänglich ist, so dass biologisch relevante Moleküle untersucht werden können, die häufig gerade bei niedrigen Kräften interessante Aktivitäten aufweisen (optische Pinzette: 0,1-100 pN, AFM:  $10\text{-}10^4$  pN). Nachteile gegenüber dem AFM sind jedoch, dass aufgrund der hohen Laserleistungen die Probe lokal erhitzt wird und dies Auswirkungen auf die Aktivität und die Struktur des zu untersuchenden Moleküls haben kann. Schwierigkeiten bei kraftspektroskopischen Messungen mit AFM und optischer Pinzette liegen darin, dass bisher die Durchsatzrate bei Messungen noch gering ist, da die Moleküle seriell und nicht parallel gemessen werden können. Erste Arbeiten versuchten dieses Problem zu lösen. Ribeck und Saleh [6] führten Versuche mit magnetischen Fallen an mehreren Einzelmolekülen parallel durch, wohingegen Halvorsen und Wong auf mehrere Einzelmoleküle zeitgleich eine Zentrifugalkraft ausübten und die daraus resultierenden Abstandsänderungen der Teilchen beobachteten [7]. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, dass die zu untersuchende Probe physikalisch an die makroskopische Welt gebunden ist durch ihre Verknüpfung mit einem mikrometergroßen Messinstrument (AFM Spitze, dielektrische/magnetische Kugel). Dies führt zu thermischem Drift und Rauschen, welche wiederum die Sensitivität der Messung limitieren und die Dynamiken des zu untersuchenden Systems einschränken. Ein weiterer Nachteil ist, dass der Anspruch minimale Veränderungen des Abstands, die beispielsweise beim Binden von Transkriptionsfaktoren an DNA entstehen, zu bestimmen extrem aufwendig ist. Um diese Probleme zu umgehen wurden bereits in der Vergangenheit nanoskopische DNA-Objekte hergestellt, die in der Lage waren, Kräfte im Piconewton-Bereich autonom mithilfe des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zu messen [8–10]. Die Nachteile all dieser Methoden sind, dass die DNA-Systeme nicht ausreichend regulierbar sind, um die Auswirkungen von Kräften auf biologische Systeme zu testen. Daher haben wir eine DNA-Origami basierte nanoskopische Kraftklammer entwickelt [11], mit der es möglich ist, Kräfte auf viele Moleküle parallel auszuüben und jede einzelne Reaktion gleichzeitig zu messen. Dabei ist eine physikalische Bindung an die makroskopische Welt nicht nötig und gleichzeitig ist ein großer Kräftebereich (0-12 pN, theoretisch  $\sim 50$  pN) zugänglich. Ein DNA-Origami [12] ist ein zwei- bzw. dreidimensionales Gebilde, das aus einem langen zirkulären DNA-Einzelstrang besteht, der durch viele kurze DNA-Einzelstränge in die entsprechende Form gefaltet wird. Die Kraftklammer besteht aus einer Klammer-förmigen Basis, in deren freier Mitte sich ein Bereich einzelsträngiger DNA befindet, der als entropische Feder angenähert werden kann. In der Mitte der Feder befindet sich eine DNA-Sequenz, die je nach Anwendung modifiziert werden kann um als Bereich zu fungieren, an dem das Protein anbindet. Durch Verändern der Anzahl an Basen in der Feder kann die Kraft von Null bis zwölf Piconewton variiert werden. Mithilfe des Förster-Resonanz-Energie-Transfers kann die Kraftabhängigkeit der Proteine optisch ausgelesen werden. Ziel dieser Arbeit war es unter Verwendung der gut untersuchten Holliday Junction zu zeigen, dass das System funktioniert und durch Untersuchen der Kraftauswirkung auf das TATA-Box-bindende Protein (TBP) die Anwendbarkeit für biologische Systeme zu beweisen.

## 1.2. DNA-Origami basierter Lichtsammelkomplex

Der Förster-Resonanz-Energietransfer findet weiterhin bei der Photosynthese statt. Dabei wird Licht von Lichtsammelkomplexen (LSK) absorbiert und zum Reaktionszentrum geleitet. Ein LSK besteht aus Farbstoff-Protein-Komplexen, die dicht nebeneinanderliegen und Licht absorbieren und über Energietransfer die Energie bis zum Reaktionszentrum weiterleiten. So wird der Querschnitt vergrößert in dem Licht absorbiert wird (bis zu 100-fach). Durch den Einsatz unterschiedlicher Farbstoffmoleküle wird zudem das Absorptionsspektrum verbreitert. Der Energie-Transfer zwischen den Farbstoffmolekülen ist sehr effizient und sehr schnell (10-100 ps). Damit die Absorption maximiert wird, müssen sehr viele Farbstoffmoleküle gebunden und optimal zueinander ausgerichtet sein. Purpurbakterien haben beispielsweise 50 bis 250 Farbstoffmoleküle [13] auf ein Reaktionszentrum. Bei ihnen sind die Farbstoffmoleküle ringförmig in einem LSK angeordnet (siehe Abbildung 2A).

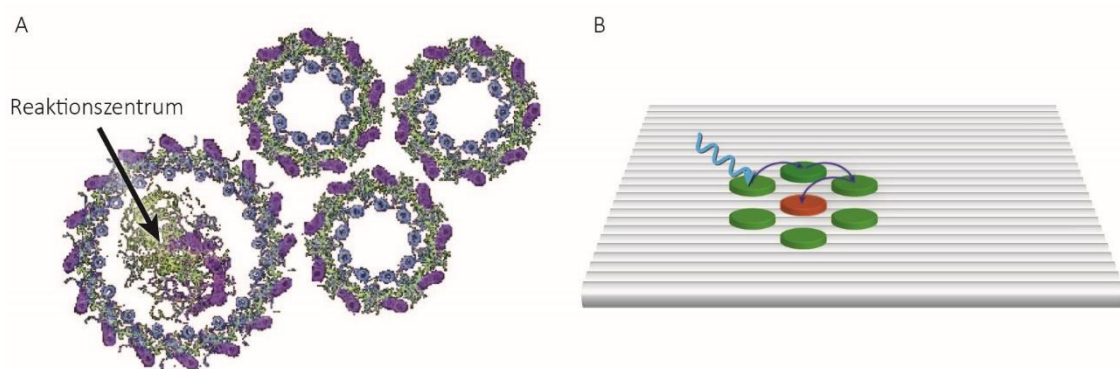


Abbildung 2: A) Lichtsammelkomplex der Purpurbakterien (verändert nach [14]). B) Schematische Darstellung des rechteckigen DNA-Origamis mit sechs ringförmig angeordneten Donoren und einem Akzeptor in deren Zentrum.

Es gibt LSKs mit einem Reaktionszentrum in der Mitte und solche, die kein Reaktionszentrum haben, sondern nur die Energie an benachbarte LSKs weiterleiten bzw. bei zu starker Lichteinstrahlung ein „Verbrennen“ des Bakteriums verhindern, in dessen Mitte sich ein Reaktionszentrum befindet. Obwohl bereits viele Untersuchungen zu LSK durchgeführt wurden, gibt es noch immer keine klaren Design-Grundsätze für das Erstellen artifiziereller photosynthetischer LSK. Mit DNA lassen sich wie bereits beschrieben Matrizen erstellen, auf denen Farbstoffmoleküle spezifisch angebunden werden können. Die bisher ausgeführten Messungen mit solchen Strukturen [15, 16] leiden jedoch unter der geringen Stabilität, Probenheterogenität und Unsicherheiten in der Struktur. Elisa A. Hemmig et al. entwickelten ein Design, das aus einem rechteckigen DNA-Origami besteht und auf dem ein bis sechs Donormoleküle ringförmig um ein Akzeptormolekül angebracht sind [17]. Das DNA-Origami ermöglicht die präzise Anordnung der Farbstoffmoleküle in wohldefinierten Abständen bei gleichzeitiger Robustheit und Reproduzierbarkeit. Das Ziel dieser Arbeit ist es diese DNA-Origami-Antenne mittels Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie zu charakterisieren.



### 1.3. DNA-Origami basierte Nanoantennen

Obwohl die oben beschriebenen Anwendungen der Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie zeigen, wie wichtig diese für die Charakterisierung von Biomolekülen ist, bleibt sie bisher fast ohne Anwendung. Dies liegt daran, dass es nur einen kleinen verwendbaren Konzentrationsbereich gibt, in dem Einzelmoleküle detektiert werden können. Aufgrund des Beugungslimits des Lichts ist so beispielsweise bei konfokalen Mikroskopen der Detektionsbereich etwa 250 nm im Durchmesser, welches ein Anregungsvolumen im Femtoliterbereich ( $10^{-15}$  L) ergibt. Damit nun immer nur ein Molekül in dem Anregungsvolumen vorhanden ist, muss die Konzentration an fluoreszierenden Molekülen bei maximal zwei Nanomolar liegen. Dies bedeutet, dass Proben verdünnt werden müssen (bis in den pikomolaren Bereich), um sie untersuchen zu können. Diese Verringerung der Konzentration führt dazu, dass in der Natur biologisch relevante Interaktionen, die nur im nanomolaren bis millimolaren Bereich stattfinden, nicht mehr untersucht werden können. Die Dissoziationskonstante von MjTBP (TBP aus *Methanocaldococcus janaschi*) liegt beispielsweise bei 48 nM [2]. Wird eine viel geringere Konzentration an TBP und DNA verwendet, so führt dies dazu, dass nur wenige Komplexe gebildet werden und hauptsächlich Protein und DNA einzeln vorliegen. Um dieses Problem zu umgehen gibt es verschiedene Ansätze, die im Folgenden diskutiert werden.

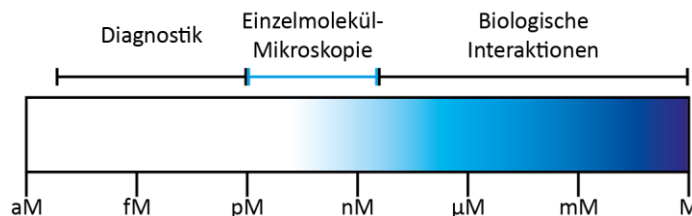


Abbildung 3: Darstellung des relevanten Konzentrationsbereichs für biologische Untersuchungen. Die Einzelmolekülspektroskopie liegt im Pikomolaren bis in den niedrigen Nanomolaren Bereich. Für die Diagnostik hingegen werden Konzentrationen weit unter einem Pikomolar benötigt. Dies wäre für Einzelmolekülmessungen deutlich zu zeitaufwändig. Demgegenüber stehen die sehr hohen benötigten Konzentrationen für die Untersuchung biologischer Interaktionen. Dies ist mit Einzelmolekülmikroskopie unmöglich zu messen, da die Proben stark verdünnt werden müssten, um zu gewährleisten, dass sich immer nur ein Molekül pro Zeiteinheit im Anregungsvolumen befindet. (verändert nach [18]).

Nur eine der beiden zu untersuchenden Spezies (z.B. die DNA) wird fluoreszenzmarkiert und in einer niedrigen Konzentration eingesetzt. Die zweite Komponente (z.B. das TBP) wird nicht markiert und in einem Überschuss zugeführt. Die Bindung des nicht markierten TBPs an die fluoreszenz-markierte DNA wird dann nicht durch eine Koloaliation zweier Farbstoffmoleküle gemessen, sondern durch die Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften (z.B. Änderung des FRET-Wertes) der markierten Spezies nachgewiesen.

Eine weitere Möglichkeit bei hohen Konzentrationen zu messen ist es das Anregungsvolumen zu verringern. Die Verringerung des Anregungsvolumens führt jedoch zu einer Limitierung der Summe des gesammelten Lichts pro Molekül und verschlechtert so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Entsprechend müssen bei Einzelmolekülmessungen die Datenaufnahmezeiten verlängert werden, was mit höheren Anforderungen an die Farbstoffmoleküle einhergeht. Diese müssen eine hohe Quantenausbeute besitzen und eine gute Photostabilität. Eine beliebte Form bei hohen Konzentrationen Einzelmoleküle aufzulösen ist die Superauflösungsmikroskopie. Bei dieser existieren zwei wichtige Richtungen: Die Verkleinerung des Anregungsvolumens mit optischen Mitteln (STED, *stimulated emission depletion*) und die Lokalisierung von zeitlich versetzt

leuchtenden Molekülen (Lokalisierungsmikroskopie, *stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie* STORM, *photo-aktivierte Lokalisationsmikroskopie* PALM). Obwohl diese Superauflöstechniken häufig für die Abbildung in der Zellbiologie verwendet werden, eignen sie sich nicht um Dynamiken und Interaktionen zwischen Proteinen aufzuklären. Daher wurde eine Nahfeldmethode entwickelt, bei der Detektionsvolumina mit einem Durchmesser kleiner als das Beugungslimit verwendet werden, um Biomoleküle zu analysieren. Bei diesen sogenannten Nanoaperturen, oder Zero-Mode Waveguides (ZMW, siehe Abbildung 4 A) befinden sich in einem Metallfilm Löcher mit einem Durchmesser von 50 bis 200 nm. Da die ZMWs kleiner als die Wellenlänge des Anregungslichtes sind, kommt es zu der Ausbildung einer evaneszenten Welle. Diese dringt nur wenige Nanometer in die Löcher ein, sodass nur Moleküle, die sich in einem solchen ZMW nahe der Glasoberfläche befinden, angeregt werden. Diese Verringerung des Anregungsvolumens ( $10^{-21}$  bis  $10^{-18}$  L) ermöglicht es bei Konzentrationen bis  $10 \mu\text{M}$  zu messen [19]. Eine prominente Anwendung der ZMWs ist die DNA-Sequenzierung, die kommerziell von PacificBiosciences [20] genutzt wird. Ein Nachteil der ZMWs ist die zeit- und kostenintensive Herstellung der nanophotonischen Struktur, die durch eine Poisson-Verteilung begrenzte Besetzung der Löcher und die unspezifische Anbindung der zu untersuchenden Moleküle innerhalb des ZMWs. Pibiri et al. [21] zeigten, dass sogenannte DNA-Origami Nanoadapter verwendet werden können, um exakt ein Molekül pro ZMW ortsspezifisch zu immobilisieren.

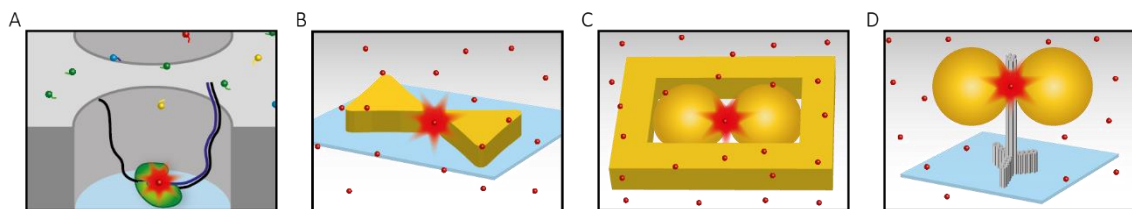


Abbildung 4: Schematische Darstellung der A) DNA-Sequenzierung durch eine DNA-Polymerase in einer Nanoapertur (verändert nach [19]), B) „bowtie“ Nanoantenne (verändert nach [22]), C) Nanoantenne in der Nanoapertur (verändert nach [23]) und D) DNA-Origami Nanoantenne (verändert nach [24]).

Eine weitere Anwendung von Nanoplasmonik, um das Anregungsvolumen zu verringern, ist die Verwendung von Nanoantennen. Ein bedeutendes Beispiel ist die „bowtie“ Nanoantenne (siehe Abbildung 4 B) von Anika Kinkhabwala et al. bei der zwei Dreiecke aus Gold gegenüberliegend auf einer Glasoberfläche angebracht sind. In der Lücke (10 nm breit) zwischen den beiden Gold-Dreiecken entsteht ein sogenannter „Hotspot“, eine Erhöhung des elektrischen Feldes. Dieses kommt dadurch zustande, dass die beiden Gold-Elemente kleiner sind als die Wellenlänge des Anregungslichtes und so eine kollektive Oszillation der Elektronen bei Beleuchtung entsteht. Diese lokalisierten Oberflächenplasmonen führen zu einer Polarisation des Metalls und durch Kopplung der beiden Elemente miteinander zur Ausbildung eines Hotspots in ihrer Mitte. Befindet sich ein Molekül in diesem Bereich erfährt dieses eine Verstärkung seiner Fluoreszenz [25]. Durch die „Fokussierung“ des Anregungslichts auf die Lücke zwischen den beiden Gold-Elementen wird das Anregungsvolumen in den Zeptoliter-Bereich verringert ( $(10 \text{ nm})^3 = 10^{-21} \text{ L}$ ). Zusätzlich zur Reduzierung des Anregungsvolumens kommt es auch zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses, da bei Farbstoffmolekülen mit niedriger Quantenausbeute diese verstärkt wird, sowie durch das verstärkte elektrische Feld auch die radiative Rate erhöht wird. Kinkhabwala et al. erreichten so mit ihrer Nanoantenne eine Fluoreszenzverstärkung von bis zu drei Größenordnungen (1340-fach). Damit sind mit Nanoantennen auch Messungen bei hohen Konzentrationen möglich, da nur die Moleküle detektiert werden, die sich im Hotspot befinden. Um das Hintergrundsignal, welches aus den Signalen der im Fokus des Anregungslasers, aber außerhalb des Hot Spots befindlichen Molekülen resultiert, zu minimieren, wurde von der Gruppe um Jerome Wenger [23] eine Nanoantenne

in einer Nanoapertur („nanoantenne-in-box“) vorgestellt (siehe Abbildung 4 C). Hierbei machten sie es sich zunutze, dass die Nanoapertur das Anregungslicht zunächst auf einen kleinen Bereich begrenzt und die Nanoantenne zusätzlich die Fluoreszenz der Moleküle im Hot Spot um mehrere Größenordnungen verstärkt. Sie konnten so eine Verstärkung von etwa 1000-fach bei einer effektiven Verringerung des Anregungsvolumens um den Faktor 8000 erreichen.

Sowohl die Zero-Mode-Waveguides als auch die vorgestellten Nanoantennen haben allerdings den Nachteil, dass sie mittels Lithographie hergestellt werden, die teuer und aufwendig ist. Zudem ist eine Immobilisierung des zu untersuchenden Moleküls im Hotspot sehr schwierig. Als Alternative wurde 2012 von Guillermo Acuna et al. [24] die DNA-Origami Nanoantenne vorgestellt (siehe Abbildung 4 D). Aus einem langen zirkulären Gerüststrang und vielen kleineren Heftsträngen entsteht durch Selbstassemblierung eine dreidimensionale Struktur aus DNA, das DNA-Origami [12]. Dieses dient als molekulares Steckbrett, an das mit Nanometerpräzision metallische Nanopartikel (mNP), Farbstoffmoleküle und Proteine angebracht werden können. So konnte einerseits gezeigt werden, dass bei Konzentrationen um 500 nM noch Einzelmoleküle detektiert werden konnten und auch eine Holliday Junction im Hotspot ihre biologische Funktionalität nicht verliert. Durch eine Modifizierung der DNA-Origami-Struktur konnte sogar eine 5000-fache Fluoreszenzverstärkung und Einzelmolekülmessung bei einer Konzentration von 25  $\mu$ M durchgeführt werden [26]. Auf Grund der hohen Fluoreszenzverstärkung ist es möglich ultra-schnelle Prozesse zu untersuchen, da mehr Photonen pro Zeiteinheit detektiert werden können und so die zeitliche Auflösung verbessert werden kann ohne das Signal-zu-Rausch-Verhältnis signifikant zu verschlechtern. Da bei der Selbstassemblierung des DNA-Origamis mehrere tausend Moleküle parallel entstehen, die wiederum nebeneinander an Glas gebunden und mit mNP funktionalisiert werden können, ist eine hohe Zeitersparnis bei der Probenherstellung zu verzeichnen. Zudem ist auch die Datenaufnahme stark verkürzt, da mehrere hundert Moleküle parallel untersucht werden können. Dies ermöglicht es nicht nur bei hohen Konzentrationen zu messen, sondern auch bei besonders niedrigen und eröffnet somit den Weg zu molekularer Diagnostik mittels Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie.

Um die vorgestellte Nanoantenne genauer zu charakterisieren, um sie für DNA-Sequenzierung und molekulare Diagnostik anwendbar zu machen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein konfokales Fluoreszenzmikroskop um ein hyperspektrales Dunkelfeld-Mikroskop erweitert. Mit diesem ist es möglich Aufnahmen der Streuspektren von individuellen Nanoantennen zu machen und sie mit dem entsprechenden Fluoreszenzsignal zu korrelieren (siehe Abbildung 5). Zu verstehen, wie die Interaktion zwischen mNP und Farbstoffmolekülen abläuft, ist essentiell wichtig um die Emission von Fluoreszenz auf der Nanoebene voraussagen zu können. Die Wechselwirkung zwischen metallischen Nanostrukturen und Farbstoffmolekülen können zwar numerisch und theoretisch vorhergesagt werden, allerdings stimmen sie selten mit den Experimenten überein. Dies liegt darin begründet, dass es nahezu unmöglich ist Strukturen herzustellen, die exakt der berechneten Form entsprechen. Zudem ist es schwierig mittels Simulationen alle denkbaren Abweichungen von der erwarteten Struktur zu berechnen. Dies würde mehr Zeit und Rechenspeicher beanspruchen als sinnvoll ist.

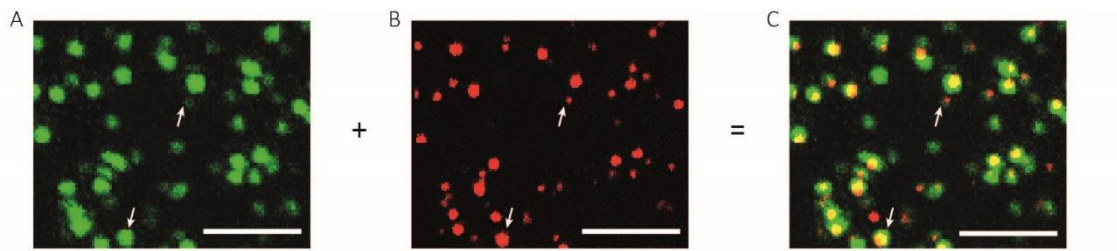


Abbildung 5: A) Dunkelfeldaufnahme von der Nanoantenne mit 60 nm großen Gold-Nanopartikeln. Die Pfeile markieren jeweils ein Monomer (oben) und ein Dimer (unten). B) Fluoreszenzbild der gleichen Oberfläche. C) Korrelation der Dunkelfeldaufnahme und des Fluoreszenzbildes. Skala: 5  $\mu\text{m}$ .

Das Ziel dieser Arbeit war es eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht DNA-Origami Nanoantennen unterschiedlicher Zusammensetzung zu charakterisieren. Dies umfasst die Erweiterung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops um ein hyperspektrales Dunkelfeldmikroskop, die Versuchsplanung, die Erstellung von Algorithmen für die Datenanalyse und den Vergleich mit analytischen und numerischen Kalkulationen.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Photophysik organischer Farbstoffmoleküle

Bei der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie werden fluoreszierende Farbstoffmoleküle verwendet, die im sichtbaren Bereich absorbieren und emittieren (i.d.R. 405 nm-720 nm). Deren photoaktives Zentrum besteht aus Kohlenstoffatomen, die durch eine wechselnde Abfolge von Einfach- und Doppelbindungen ein delokalisiertes  $\pi$ -Elektronen-System bilden. Je nach Größe dieses delokalisierten  $\pi$ -Elektronen-Systems können Farbstoffmoleküle Photonen unterschiedlicher Wellenlänge absorbieren bzw. emittieren. Die Energie eines Photons ist abhängig von dessen Wellenlänge  $\lambda_{\text{ph}}$ , der Lichtgeschwindigkeit ( $c = 299.792.458 \text{ m/s}$ ) und dem Planck'schen Wirkungsquantum ( $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ):

$$E_{\text{ph}} = \frac{h \cdot c}{\lambda_{\text{ph}}} \quad (1)$$

Die in einem Farbstoff stattfindenden Prozesse bei der Wechselwirkung mit Photonen können durch ein Jablonski-Diagramm dargestellt werden (siehe Abbildung 6). Bei der Absorption eines Photons wird ein Elektron vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  in ein Schwingungsniveau des elektronisch angeregten Zustands  $S_n$  angehoben. Die Energiedifferenz zwischen dem aktuellen Energieniveau und dem elektronischen Grundzustand  $S_0$  entspricht der Energie des absorbierten Photons. Die Anregungsrate eines Farbstoffmoleküls  $k_{\text{exc}}$  entspricht dem Produkt aus dem Absorptionsquerschnitt und der Anregungsintensität. Innerhalb weniger Pikosekunden relaxiert das Farbstoffmolekül strahlungslos in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands  $S_n$ . Dieser Übergang wird Innere Umwandlung (engl. *internal conversion*, IC) genannt. Hierbei verändert sich der Spinzustand nicht. Von diesem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands aus kann das Farbstoffmolekül unter Emission von Photonen (Fluoreszenz) innerhalb weniger Nanosekunden in einen Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands  $S_0$  zurückkehren. Auch dies geschieht unter Beibehaltung der Spin-Multiplizität. Michael Kasha formulierte die These 1950, dass Fluoreszenz immer vom Schwingungsgrundzustand eines elektronisch angeregten Zustands  $S_n$  ausgehen muss [27]. Da die Bewegung der Elektronen zwischen den verschiedenen Energieniveaus so schnell geschieht, dass der Kernabstand sich in diesem Zeitraum nicht verändert, sind alle Übergänge vertikal (Franck-Condon-Prinzip [28, 29]). So kommt es dazu, dass das Emissionsspektrum spiegelbildlich zum Absorptionsspektrum aufgebaut ist. Je wahrscheinlicher ein Übergang ist, desto ausgeprägter (höhere Intensität) hat die entsprechende Bande im Absorptions-/Fluoreszenzspektrum. Gelangt das Farbstoffmolekül bei der Emission eines Photons in einen angeregten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands  $S_0$ , so muss er seine Restenergie strahlungslos (Innere Umwandlung) abgeben. Dies bedeutet, dass das Farbstoffmolekül ein Photon geringerer Energie (höherer Wellenlänge) ausgesendet hat als es absorbiert hat. So kommt es dazu, dass das Emissionsspektrum rot-verschoben gegenüber dem Absorptionsspektrum ist (Stokes-Shift). Abgesehen von der Fluoreszenz kann vom angeregten elektronischen Zustand auch ein strahlungsloser Übergang in einen Triplett-Zustand  $T_n$  stattfinden, die sogenannte Interkombination (engl. *intersystem crossing*, ISC). Dieser Übergang ist mit einer Veränderung der Spin-Multiplizität verbunden. Der Übergang vom Triplett-Zustand in den elektronischen Grundzustand kann durch das Aussenden eines Photons geschehen (Phosphoreszenz) oder durch einen weiteren strahlungslosen Übergang ( $k_T$ ). Da die Phosphoreszenz bei organischen Farbstoffmolekülen nicht auftritt und der strahlungslose Übergang mehrere Mikro- bis Millisekunden dauern kann, kommt es zu kurzen Auszeiten des Farbstoffmoleküls, dem Photoblinken. Eine weitere Möglichkeit der Entvölkerung des Triplett-Zustands ist die Reaktion des Farbstoffmoleküls mit einem Oxidations- oder Reduktionsmittel zu einem Radikalkation, bzw. -anion. Von

dort aus kann es wiederum durch eine Reduktion oder Oxidation in den elektronischen Grundzustand zurückkehren. Wie lange das Farbstoffmolekül in dem Radikalzustand bleibt ist dabei abhängig von der Konzentration an Reduktions- bzw. Oxidationsmitteln. Dies wird genauer im Kapitel 2.1.1 diskutiert werden.

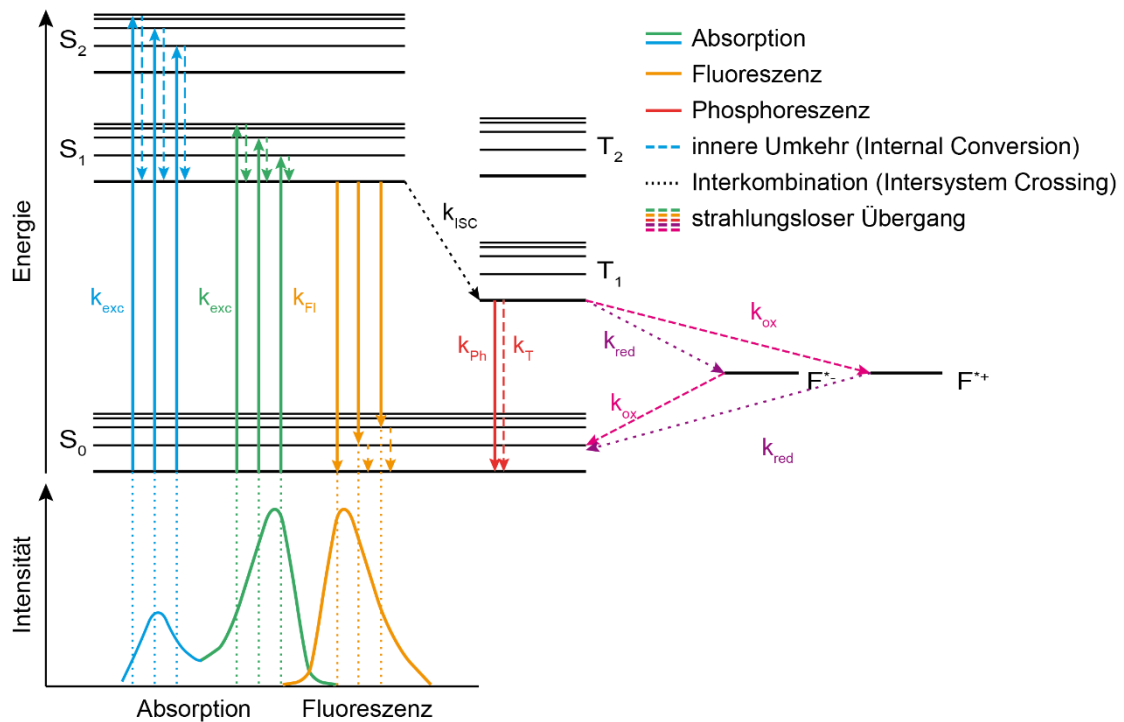


Abbildung 6: Jablonski-Diagramm für organische Farbstoffmoleküle. Die Rotationslevel wurden zur Übersichtlichkeit nicht mit aufgenommen. Die Energieniveaus der Radikalzustände sind je nach Farbstoff unterschiedlich hoch. Die Übergänge unter Absorption (blau, grün) und Emission von Photonen (orange, rot) sind mit durchgezogenen Linien dargestellt, wohingegen die strahlungslosen Übergänge durch gestrichelte Linien dargestellt werden.

Die Lebensdauer eines elektronischen Zustands ist definiert als die reziproke Summe aller Raten, die diesen Zustand entvölkern. Damit ist die Fluoreszenzlebensdauer eines Farbstoffmoleküls gegeben als

$$\tau_{FI} = \frac{1}{k_{FI} + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2)$$

Bei zeit-aufgelösten Einzelphotonen Messungen (TCSPC, *time-correlated single-photon counting*) werden mit einer festgelegten Frequenz (in der Regel 80 MHz) ultrakurze Lichtimpulse ( $<1$  ns) ausgesendet. Somit erreicht alle 12,5 ns ein Photon ein Molekül und kann dieses in ein höheres Energieniveau anregen. Das vom Molekül anschließend emittierte Photon wird von einem Detektor registriert und mit einem Zeitstempel versehen. Werden über einen längeren Zeitraum die Zeitdifferenzen zwischen Lichtpuls und Photonendetektion gemessen und in einem Histogramm dargestellt ergibt sich eine Fluoreszenzabklingkurve. Durch Anpassen einer exponentiellen Funktion an die gemessene Kurve kann die Fluoreszenzlebensdauer ermittelt werden:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (3)$$

Wie gut ein Farbstoff in der Lage ist, seine absorbierten Photonen in Fluoreszenz umzuwandeln, gibt die Fluoreszenzquantenausbeute an. Sie ist das Verhältnis an emittierten Photonen zu absorbierten Photonen und kann berechnet werden aus dem Quotient aus der Fluoreszenzrate und der Summe aller Raten, die den Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustands entvölkern:

$$Q_{\text{FI}} = \frac{k_{\text{FI}}}{k_{\text{FI}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}}} \quad (4)$$

### 2.1.1. Photostabilisierung von Farbstoffmolekülen

Wenn Farbstoffmoleküle über einen längeren Zeitraum mit Licht hoher Intensität bestrahlt werden, kommt es unweigerlich zu dem Effekt des Photobleichens. Die häufigste Ursache hierfür ist die Reaktion des Farbstoffmoleküls im Triplett-Zustand mit Triplett-Sauerstoff. Dabei entsteht reaktiver Singulett-Sauerstoff, der anschließend mit dem Farbstoff im  $S_1$  oder auch  $S_0$  Zustand reagieren kann und so den Farbstoff irreversibel zerstört [30]. Um dies zu verhindern wird ein enzymatisches System verwendet, welches den Sauerstoff aus der Lösung entzieht. Häufig wird dafür Glucoseoxidase und Katalase verwendet, seltener auch Protocatechusäure-Dioxygenase [31, 32].

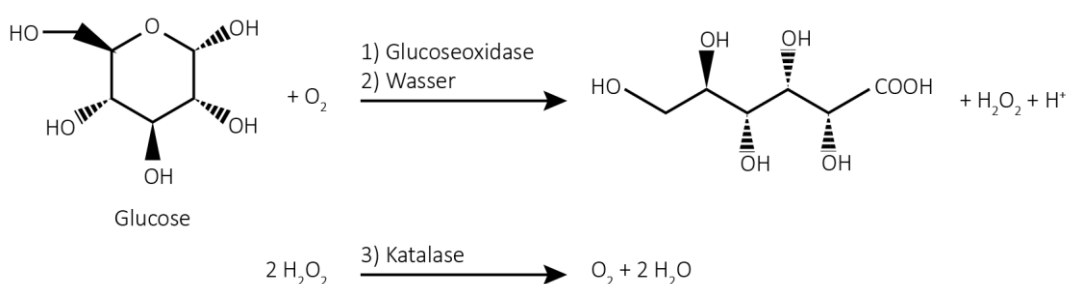


Abbildung 7: Enzymatischer Sauerstoffentzug mit Glucoseoxidase und Katalase.

Da durch den Sauerstoffentzug der Triplett-Zustand nun nicht mehr entvölkert werden kann und der Triplett-Zustand ein langlebiger Zustand ist, kommt es zu langen Auszeiten des Farbstoffmoleküls, was sich in Fluoreszenzblinken zum Ausdruck bringt. Um die Auszustände möglichst kurz zu halten, können Reduktions- und Oxidationsmittel in den Messpuffer gegeben werden [33]. Diese reagieren mit dem Farbstoff im Triplettzustand und überführen diesen in einen kationischen oder anionischen Radikalzustand (s. Abbildung 6) aus dem er dann mittels eines Oxidations- bzw. Reduktionsmittels wieder in den elektronischen Grundzustand  $S_0$  zurückgebracht werden kann. Da die Reduktions- und Oxidationsschritte sehr schnell verlaufen, treten keine unerwünschten Nebenreaktionen vom Triplettzustand aus auf und die Auszustände des Farbstoffmoleküls sind so kurz, dass sie in nahezu allen Messungen nicht mehr messbar sind. Dieses System aus Reduktions- und Oxidationsmittel (ROXS, engl. *reducing and oxidizing system*) zur Fluoreszenzstabilisierung von Farbstoffmolekülen wurde 2008 durch die Arbeitsgruppen Tinnefeld und Sauer bekannt gemacht [33].

### 2.1.2. Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Befinden sich zwei Farbstoffmoleküle in unmittelbarer Nähe zueinander (typischerweise weniger als 10 nm voneinander entfernt), so kann die Energie von einem Farbstoffmolekül strahlungslos auf das zweite übertragen werden. Eine solche Dipol-Dipol-Wechselwirkung ohne direkten Kontakt der beiden Farbstoffmoleküle wird Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) genannt [34]. Bei den meisten Anwendungen werden zwei Farbstoffmoleküle mit unterschiedlichen Energien verwendet. Das Farbstoffmolekül mit der höheren Energie, der Donor, überträgt seine Energie strahlungslos auf den Farbstoff mit niedrigerer Energie, den Akzeptor. In Abbildung 8A ist ein solcher Energieübertrag in einem Jablonski-Diagramm skizziert. Der Donor wird durch die Absorption eines kurzwelligen Photons von seinem elektronischen Grundzustand  $S_0$  in einen schwingungsangeregten Zustand des ersten elektronisch angeregten Zustands  $S_1$  überführt. Von dort aus relaxiert der Donor in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands (IC). Von dort aus kann der Donor entweder Photonen emittieren (Fluoreszenz) oder seine Energie strahlungslos auf den Akzeptor übertragen (FRET). Dadurch wird letzterer vom Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Zustand  $S_1$  angeregt. Nach einer Inneren Umwandlung in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands  $S_1$ , kann das Farbstoffmolekül unter Aussendung eines Photons wieder in seinen Grundzustand  $S_0$  zurückkehren. Der Förster-Resonanz-Energie-Transfer ist ein abstandssensitiver Prozess. Je kürzer der Abstand zwischen den beiden Farbstoffmolekülen gewählt wird, umso mehr Energie kann vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden (siehe Abbildung 8 B und C).

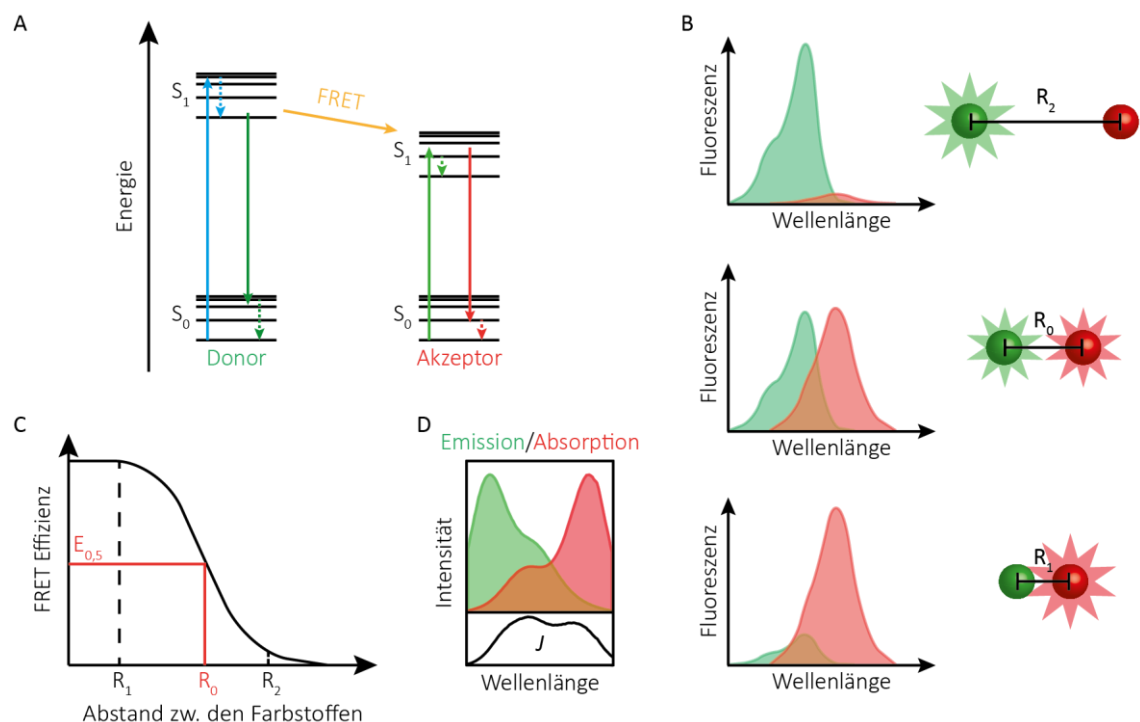


Abbildung 8: A) Jablonski-Diagramm des Förster-Resonanz-Energie-Transfers. B) Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) von dem Abstand zwischen ihnen ( $R_n$ ). C) Die FRET-Effizienz hängt direkt von dem Abstand zwischen dem Donor und dem Akzeptor ab. Der Abstand, bei dem die FRET-Effizienz 0,5 beträgt ist der Förster-Radius. D) Darstellung der Überlappung des Emissionsspektrums eines Donors mit dem Absorptionsspektrum eines Akzeptors und des daraus berechneten Überlappintegrals  $J$ .



Dies bedeutet dementsprechend, dass das Verhältnis zwischen Akzeptor-Emission und Donor-Emission angibt, wieviel Energie übertragen wird [35, 36]:

$$E = \frac{I_{D,A}}{I_{D,A} + I_{D,D}} \quad (5)$$

$I_{D,A}$  = Akzeptor-Emission bei Donor-Anregung,  $I_{D,D}$  = Donor-Emission bei Donor-Anregung

E ist die FRET-Effizienz und kann auch über ihre Abstandsabhängigkeit (siehe Abbildung 8 C) beschrieben werden:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (6)$$

Hier ist  $R$  der Abstand zwischen den beiden Farbstoffmolekülen und  $R_0$  der sogenannte Försterradius. Dies ist der Abstand zwischen den beiden Farbstoffmolekülen, bei denen die FRET-Effizienz den Wert 0,5 annimmt. Dieser ist abhängig von der Quantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors, dem Dipol-Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  ( $= 2/3$  für freibewegliche Farbstoffmoleküle [37]), dem Überlappintegral  $J$ , sowie dem Brechungsindex des umgebenden Mediums  $n$  ( $= 1,33$  für Wasser).

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9\phi_D \ln(10)\kappa^2 J}{128\pi^5 n^4 N_A}} \quad (7)$$

Das Überlappintegral (siehe Abbildung 8 D) ist wiederum abhängig von dem Emissionsspektrum des Donors  $f_D(\lambda)$  und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors  $\varepsilon_A(\lambda)$ .

(8)

$$J = \int f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

FRET auf Einzelmolekülebene wurde bereits 1996 von der Arbeitsgruppe von S. Weiss [38] das erste Mal beobachtet und publiziert. Dies war der Start für die Einzelmolekül-FRET-Mikroskopie (smFRET, *single-molecule FRET*). Mit der Ausweitung der FRET-Messungen auf die Einzelmolekülebene kamen neue Anforderungen an die Farbstoffmoleküle hinzu. Sie müssen sehr hell sein, also eine hohe Quantenausbeute und einen großen Extinktionskoeffizienten haben, damit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR, *signal-to-noise ratio*) möglichst groß ist. Zudem muss auch eine ausreichende Photostabilität gewährleistet sein, also kein Blinken, kein Wechsel zwischen unterschiedlichen Intensitätsstufen und eine lange Lebensdauer des Farbstoffs vor Photobleichen. Die Stabilität kann entweder direkt bei dem Farbstoffmolekül gegeben sein oder durch Zugabe von stabilisierenden Mitteln (ROXS, Sauerstoffentzug [33]) hergestellt werden. Die Farbstoffmoleküle sollten nicht dazu tendieren, mit der Probe, an die sie angebracht werden, einen Komplex zu bilden oder eine chemische Reaktion einzugehen. Des Weiteren müssen die Farbstoffmoleküle wasserlöslich sein und kleiner als einen Nanometer, um bei kleinen Abständen ohne großen Einfluss des Farbstoffs selbst genaue FRET-Werte erhalten zu können. Das FRET-Paar selbst sollte ferner einen großen spektralen Unterschied zwischen der Emission des Donors und des Akzeptors aufweisen, um ein Übersprechen der Donor-Emission in den Akzeptor-Kanal zu vermeiden.

## 2.2. Plasmonen in metallischen Nanopartikeln

Das Feld der „Plasmonik“ umfasst die Wechselwirkung von Licht, also elektromagnetischer Strahlung mit metallischen Nanostrukturen. In Kapitel 2.2.1 werden die Entstehung von lokalisierten Oberflächenplasmonen und die physikalischen Zusammenhänge genauer erörtert. Die Kapitel 2.2.3 und 2.2.4 beschäftigen sich dann mit den gängigen Theorien zu den optischen Eigenschaften von metallischen Nanopartikeln (mNP). Und in Kapitel 2.2.5 wird schließlich die Wechselwirkung von Licht, mNP und Farbstoffmolekülen beschrieben, die für diese Arbeit wichtig ist.

### 2.2.1. Lokalisierte Oberflächenplasmonen

MNP sind Teilchen, die aus einem Metall bestehen und zwischen 1 und 100 nm groß sind und somit um ein vielfaches kleiner als die Wellenlänge des (sichtbaren) Lichts. Ihre optischen und elektrischen Eigenschaften sind ähnlich zu denen des makroskopischen Metalls (engl. *bulk*). Die Resonanz liegt im optischen Bereich und hängt hauptsächlich von der Größe, Form und der Umgebung der mNP ab.

Im Jahr 1900 entwickelte Paul Drude [39, 40] ein einfaches Modell für den Ladungstransport in Metallen bei Einwirken eines elektrischen Feldes, welches 1933 durch Arnold Sommerfeld um die Quantenmechanik [41] erweitert wurde. In diesem Modell wird die Annahme getroffen, dass die Leitungselektronen sich frei und unabhängig im Raum bewegen, analog zu einem idealen Gas, wobei sie durch Stöße mit Gitter-Ionen, Elektronen, Phononen usw. ihre Bewegungsrichtung ändern. Die sehr kleinen positiv geladenen Atomrümpfe bilden aufgrund ihrer vergleichsweise großen Masse ein unbewegliches Ionengitter. Ein von außen angelegtes elektrisches Feld (z.B. Licht) beschleunigt die Leitungselektronen und bei der passenden Frequenz setzt eine kollektive resonante Oszillation ein (Abbildung 9). Diese Frequenz wird Plasmonenresonanz oder Plasmafrequenz genannt und orientiert sich in ihrer Ausbreitungsrichtung an dem äußeren elektrischen Feld. Durch Stöße mit den Atomrümpfen, seltener mit anderen Elektronen, werden die oszillierenden Elektronen wieder gebremst. Die Resonanzfrequenz hängt hauptsächlich von der Stärke der Rückstellkraft durch das Ionengitter ab.

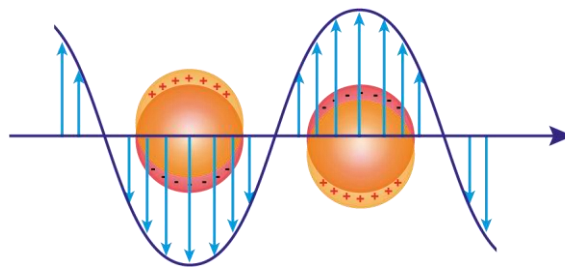


Abbildung 9: Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und metallischen Nanopartikeln.

Bei mNP ist der Bereich begrenzt, in dem sich die Plasmonen ausbreiten können, und so werden sie lokalisierte Oberflächenplasmonen genannt. Das gesamte mNP erhält durch die Bewegung der Elektronen parallel zum elektrischen Feld polarisiert (siehe Abbildung 9). Die Stärke der entstehenden Oszillation ist abhängig von der Dämpfung durch radiative und nichtradiative Prozesse und ist somit auch wiederum abhängig von der Größe der mNP und der Polarisierbarkeit des umgebenden Mediums.

So kommt es, dass Gold und Silber unterschiedlicher Größe eine unterschiedliche Färbung zeigen (siehe Abbildung 10).



Abbildung 10: Lösungen von Gold- und Silber-NP von 5 nm bis 100 nm Durchmesser, verändert nach [42].

Die Polarisierbarkeit eines mNP ist gegeben durch das Volumen  $V$  und die dielektrische Leitfähigkeit des Metalls  $\epsilon_{Me}$  sowie die dielektrische Leitfähigkeit des Vakuums  $\epsilon_0$  und des Mediums  $\epsilon_S$ . Clausius-Mossotti-Gleichung:

$$\alpha(\omega) = (1 + L)\epsilon_0 V \frac{\epsilon_{Me}(\omega) - \epsilon_S(\omega)}{\epsilon_{Me}(\omega) + L\epsilon_S(\omega)} \quad (9)$$

$L$  ist ein geometrischer Faktor, der nur durch die Form der mNP bestimmt wird und mit 2 für Kugeln angenähert wird.

Die Polarisierbarkeit ist dann maximal, wenn der Nenner gegen Null geht. Dies ist der Fall, wenn die Fröhlich-Bedingung erfüllt ist:  $\epsilon_{Me} = -2\epsilon_S$ . Sie gilt für sphärische mNP, also  $L = 2$ .

Die dielektrische Leitfähigkeit des Metalls  $\epsilon_{Me}$  kann in Abhängigkeit von der Frequenz  $\omega$  erhalten werden. Sie kann über die optischen Eigenschaften eines Metalls bei Einwirken eines äußeren elektrischen Feldes angenähert werden:

$$\epsilon_{Me}(\omega) = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (10)$$

Mit der Plasmafrequenz

$$\omega_p = \sqrt{\frac{Ne^2}{\epsilon_0 m_e^*}} \quad (11)$$

$\epsilon_\infty$  beinhaltet die Übergänge der festen „Kernelektronen“ zwischen Valenz- und Leitungsband und sollte im Idealfall 1 sein, wenn nur die Elektronen aus dem Leitungsband zur dielektrischen Leitfähigkeit beitragen.  $\gamma$  ist die Rate der Dämpfung durch Kollisionen der Elektronen.  $N$  ist die Dichte der Leitungselektronen und  $m_e^*$  ist die effektive Masse im Elektronengas.  $e$  ist die Elektronenladung und  $\epsilon_0$  die Dielektrizitätskonstante im Vakuum. Der Realteil der dielektrischen Leitfähigkeit bestimmt die Resonanzfrequenz während der Imaginärteil die Verbreiterung des Spektrums beschreibt.

Die Plasmafrequenz  $\omega_p$  liegt für die meisten Metalle im UV-Bereich. UV-Strahlung wird also bevorzugt gestreut, was der Grund dafür ist, dass Metalle im sichtbaren Licht als glänzend empfunden werden.

Wenn die Frequenz  $\omega$  viel größer als die Kollisionsrate  $\gamma$  ist, können Kollisionen vernachlässigt werden und es folgt aus (10):

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (12)$$

Für  $\omega < \omega_p$  wird das Licht vom Metall reflektiert. Für  $\omega > \omega_p$  ist das Metall transparent, da die Leitungselektronen zu langsam sind um elektromagnetische Strahlung zu reflektieren.

Die Oberflächenplasmonenfrequenz  $\omega_{\text{isp}}$  kann durch Anwenden der Fröhlich-Bedingung und Einsetzen in Gleichung (12) berechnet werden. Sie ist stark abhängig von dem umgebenden Medium  $\varepsilon_s$  und der Form der Partikel  $L$ .

$$\omega_{\text{isp}} = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + L\varepsilon_s}} \quad (13)$$

Wird das mNP mit einer Frequenz bestrahlt, die der lokalisierten Plasmonenresonanz entspricht, so ist der Wirkungsquerschnitt um ein vielfaches größer als der geometrische Wirkungsquerschnitt. Man erhält also ein elektrisches Feld, das größer ist als das eingestrahlte elektrische Feld.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie das mNP die aufgenommene Energie wieder abgeben kann. Eine Möglichkeit ist der radiative Weg, bei dem Photonen abgegeben werden (elastische Streuung), und die andere der nicht-radiative Weg, bei denen Intra- und Interbandübergänge stattfinden (siehe Abbildung 11). Während Intra- und Interbandübergänge die Anregung eines Elektrons aus dem sp-Band bezeichnen sind Interbandübergänge Anregungen von Elektronen aus dem d-Band. Diese Interbandübergänge entstehen bei der Anregung mit elektromagnetischer Strahlung hoher Energie ( $> 1,8 \text{ eV}$ ,  $< 690 \text{ nm}$ ) und führen zu angeregten Elektronen-Loch-Paaren. Durch eine Thermalisierung entstehen „heiße Elektronen“ und Löcher. Durch Elektron-Phonon-Stöße wird die überschüssige Energie an das Gitter abgegeben und dadurch in Wärme umgewandelt. Diese Interbandübergänge führen zu einer erhöhten Absorption im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums, was wiederum bei Gold zu der charakteristischen goldenen Farbe führt.

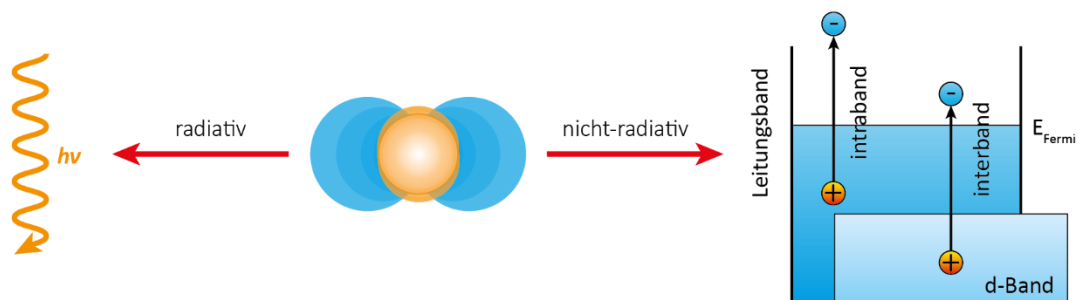


Abbildung 11: Nach der Anregung des mNP mit elektromagnetischer Strahlung kann dieses die aufgenommene Energie entweder radiativ in Form von Licht abgeben (links) oder nicht-radiativ über die Bildung eines Elektron-Loch-Paares (rechts). Dabei gibt es zwei mögliche Wege. Entweder die Intra-bandanregung innerhalb des Leitungsbandes oder die Interbandanregung aus dem tiefer liegenden d-Band in das Leitungsband, Abbildung verändert nach [43].

Silber und Gold haben zwar ähnliche Bulk Plasmafrequenzen aufgrund ihrer ähnlichen Elektronendichten, allerdings beginnen bei Gold die Interband-Übergänge bereits bei  $1,7 \text{ eV}$  ( $< 729 \text{ nm}$ ), während bei Silber diese erst bei über  $3 \text{ eV}$  ( $< 413 \text{ nm}$ ) einsetzen [44]. Diese Verbreiterung der Resonanz bei Gold im roten bis grünen Bereich des sichtbaren Lichts ist einer der Hauptgründe dafür, dass die Resonanzspektren von Silber (in der Theorie) viel schmäler sind, als die von Gold und Gold eine

stärkere Rot-Verschiebung aufweist. Zudem ist auch das Streuverhalten im gesamten sichtbaren Bereich von Silber deutlich besser als das von Gold, da Silber deutlich weniger Energieverluste durch Interbandübergänge als Gold zu verzeichnen hat. Dies macht Silber zu einem besseren Material für Nanoplasmonik als Gold. Allerdings hat Gold den Vorteil, dass es chemisch deutlich stabiler ist als Silber, welches mit Schwefelwasserstoff und Sauerstoff zu Silbersulfid reagiert, was das charakteristische „Anlaufen“ von Schmuck und Besteck zeigt. Aufgrund dieses Kontaminationsproblems ist die dielektrische Funktion von Silber nicht so gut bekannt wie die für Gold.

### 2.2.2. Absorption und Streuung – Rayleigh-Theorie

Da mNP sehr ineffiziente Lichtquellen sind geht der Großteil der aufgenommenen Energie als Wärme verloren. Daher eignen sich mNP sehr gut in der Medizin um lokal Bereiche aufzuheizen. Ob ein mNP eher streut oder absorbiert ist abhängig von seiner Größe. Bis 15 nm Durchmesser absorbieren sie stark und ab 15 nm nimmt die Streuung überhand [45]. Damit entsteht die Farbe einer Lösung aus kleinen mNP in erster Linie durch Absorption während bei größeren mNP die Streuung die Farbe gibt.

Die Streuung von Licht am Partikel ist elastisch. Dies hat zur Folge, dass das Partikel nur die Wellenlänge emittiert, mit der es angeregt wird (Abbildung 12). Im Gegensatz dazu emittiert ein Farbstoffmolekül immer über einen breiteren Spektralbereich unabhängig davon ob er mit Licht einer oder mehrerer Wellenlängen angeregt wird. Einzig die Intensität ändert sich je nach Anregungswellenlänge.

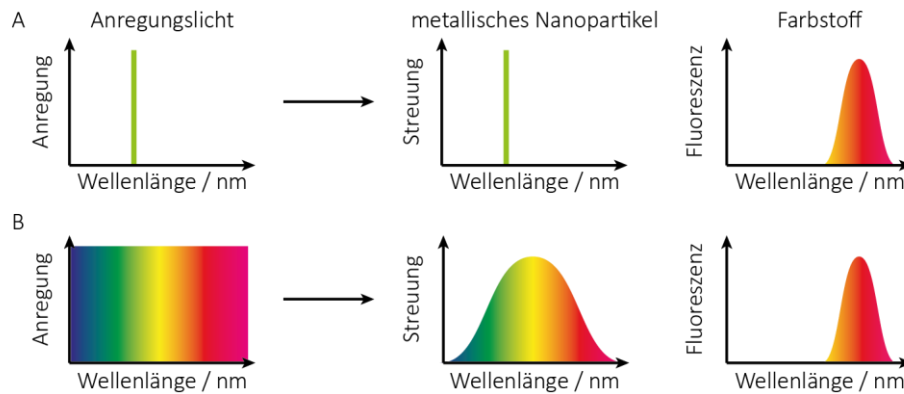


Abbildung 12: Vergleich der Streuspektren eines mNP und der Emissionsspektren eines fluoreszierenden Farbstoffmoleküls bei Anregung mit A) einer Wellenlänge und B) einem gesamten Spektralbereich.

Der Streu- und der Absorptionswirkungsquerschnitt von mNP wurden von Bohren und Huffmann 1982 [46] mathematisch beschrieben:

$$C_{\text{Scat}} = \frac{8\pi}{3} k^4 |\alpha(\omega)|^2 = \frac{8\pi}{3} k^4 R^6 \left| \frac{\epsilon_{\text{Me}} - \epsilon_{\text{S}}}{\epsilon_{\text{Me}} + 2\epsilon_{\text{S}}} \right|^2 \quad (14)$$

$$C_{\text{abs}} = 4\pi k R^3 \text{Im} \left[ \frac{\epsilon_{\text{Me}} - \epsilon_{\text{S}}}{\epsilon_{\text{Me}} + 2\epsilon_{\text{S}}} \right] \quad (15)$$

Wird für den Wellenvektor  $k$  das Produkt  $2\pi/\lambda$  eingesetzt, so wird ersichtlich, dass der Streuwirkungsquerschnitt mit der sechsten Potenz des Partikelradius skaliert während der Absorptionswirkungsquerschnitt nur von der dritten Potenz des Partikelradius abhängig ist.

$$C_{\text{Scat}} \sim \frac{R^6}{\lambda^4} \quad ; \quad C_{\text{abs}} \sim \frac{R^3}{\lambda} \quad (16)$$

Die Streuung nimmt also mit zunehmendem Radius stärker zu als die Absorption. Dies erklärt, dass kleine mNP stärker absorbieren als streuen, wohingegen bei größeren mNP die Streuung überwiegt.

Die Rayleigh-Theorie umfasst eine quasi-statische Annäherung des Verhaltens von mNP in einem elektromagnetischen Feld. Sie vernachlässigt die Effekte die durch Induktion des äußeren elektromagnetischen Feldes auftreten können und kann somit nur für sehr kleine mNP angenommen werden (bis maximal 40 nm).

In Abbildung 13 A-C sind die nach Rayleigh (15)(schwarz) und Mie (blau) berechneten Absorptionsspektren von Gold-NP unterschiedlicher Größe dargestellt. Die Berechnungen nach Rayleigh wurden mit Gleichung (15) und den Werten für die dielektrische Leitfähigkeit von Johnson und Christy [47] durchgeführt. Die Mie-Spektren wurden mit einem Mie-Kalkulator von Nanocomposix berechnet [48]. Hier ist zu sehen, dass die Spektren für 5 nm große Gold-NP und 50 nm große Gold-NP noch gut übereinstimmen während bei 100 nm Durchmesser bereits eine deutliche Rot-Verschiebung erkennbar ist.

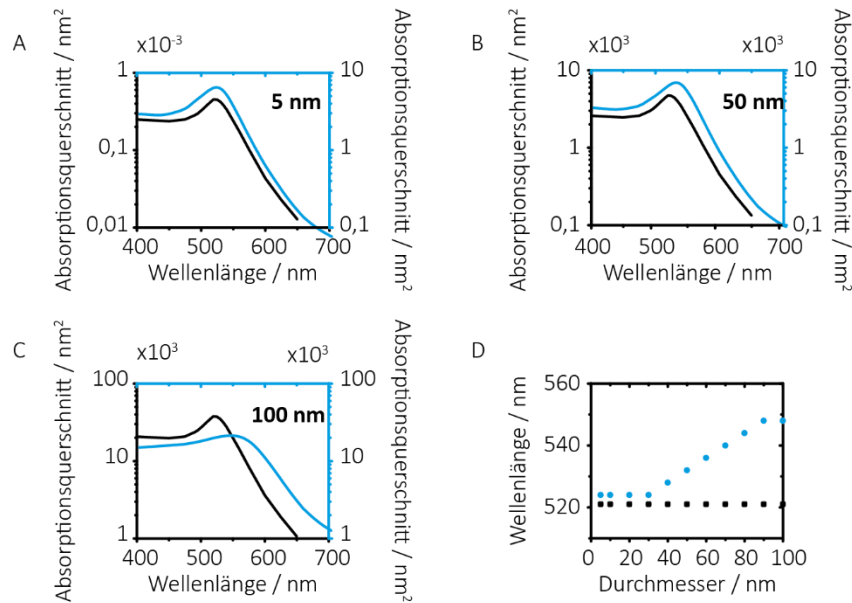


Abbildung 13: Darstellung der nach Rayleigh (schwarz) und Mie (blau) kalkulierten Absorptionsquerschnitte für Gold-NP mit einem Durchmesser von 5 nm (A), 50 nm (B) und 100 nm (C). D) Auftragung der erhaltenen Resonanzwellenlänge gegen den Durchmesser der Gold-NP für die Berechnungen nach Rayleigh (schwarz) und Mie (blau).

### 2.2.3. Optische Eigenschaften - Mie-Theorie

Bei mNP, die größer als  $\sim 25$  nm sind, kommen weitere Moden hinzu, sodass aus einem Dipol ein Multipol wird und die Spektren sich verbreitern und zu niedrigeren Energien bewegen. Je größer ein Partikel wird, desto mehr radiative Dämpfung, also die Umwandlung von Partikelplasmonen in Photonen tritt auf. 1908 entwickelte Gustav Mie eine Theorie mit der es möglich ist die Form der Spektren exakt zu berechnen [49].

$$C_{\text{Scat}} = \frac{\lambda}{2\pi\epsilon_s} \sum_{j=1}^{\infty} (2j+1)(|a_j|^2 + |b_j|^2) \quad (17)$$

Die Erweiterung um den Multipol ist gegeben durch  $j$ , wobei für die Rayleigh-Streuung, also für einen Dipol,  $j = 1$  ist (siehe Abbildung 14 A). Die Dipolmode wurde als erstes von Fröhlich [50] vorausgesagt. Die Mode mit  $j = 2$  ist ein Quadrupol (siehe Abbildung 14 B) und für größere  $j$  entstehen Multipolmoden höherer Ordnungen. In Abbildung 14 C sind die nach Mie berechneten Extinktionsspektren dargestellt. Es ist zu sehen, dass die unterschiedlichen Moden einen Anteil an dem resultierenden Extinktionsspektrum haben, der nicht vernachlässigbar ist.

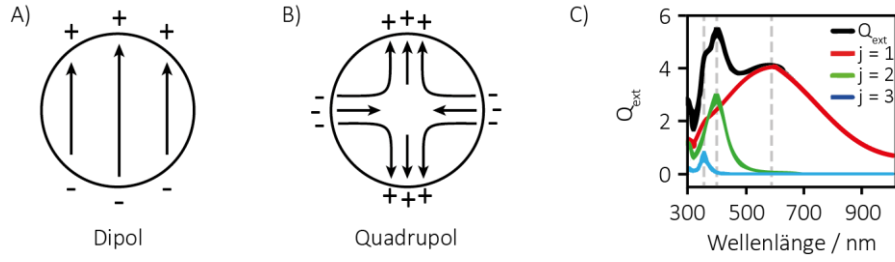


Abbildung 14: A) Dipolmode in einem mNP. B) Quadrupolmode in einem NP. C) Extinktionseffizienzen einer 200 nm großen Silberkugel für jede Multipolmode  $j = 1, 2, 3$  und die Gesamtextinktionseffizienz in Vakuum, verändert nach [45].

$a_j$  und  $b_j$  sind die Mie-Koeffizienten, die über die Ricatti-Bessel-Funktionen definiert sind:

$$a_j = \frac{m\psi_j(mkr)\psi_j'(kr) - \psi_j(kr)\psi_j'(mkr)}{m\psi_j(mkr)\xi_j'(kr) - \xi_j(kr)\psi_j'(mkr)} \quad (18)$$

$$b_j = \frac{\psi_j(mkr)\psi_j'(kr) - m\psi_j(kr)\psi_j'(mkr)}{\psi_j(mkr)\xi_j'(kr) - m\xi_j(kr)\psi_j'(mkr)} \quad (19)$$

$m$  ist der Quotient aus dem Brechungsindex des mNP zu dem Brechungsindex des Mediums,  $r = 2\pi R/\lambda$  ist das Verhältnis von Partikelradius  $R$  zur Wellenlänge des gestreuten Lichts  $\lambda$ .

Für sehr kleine mNP kann die im vorigen Kapitel genannte Rayleigh-Annäherung verwendet werden, da sie der Berechnung über die Mie-Theorie für einen Dipol ( $j = 1$ ) entspricht.

Für die Berechnungen der Absorptions- und Streuquerschnitte nach Mie wurden in der Vergangenheit online Kalkulationsprogramme geschrieben [48] und auch Skripte veröffentlicht, die beispielsweise in MATLAB ausgeführt werden können [51].

Mithilfe der Mie-Theorie können verschiedene Parameter variiert werden und die Antwort der mNP darauf erprobt werden. Carsten Sönnichsen berechnete beispielsweise in seiner Dissertation die Veränderung der Resonanzwellenlänge je nach Brechungsindex des Mediums (Abbildung 15 A) und der Größe der mNP (Abbildung 15 B).

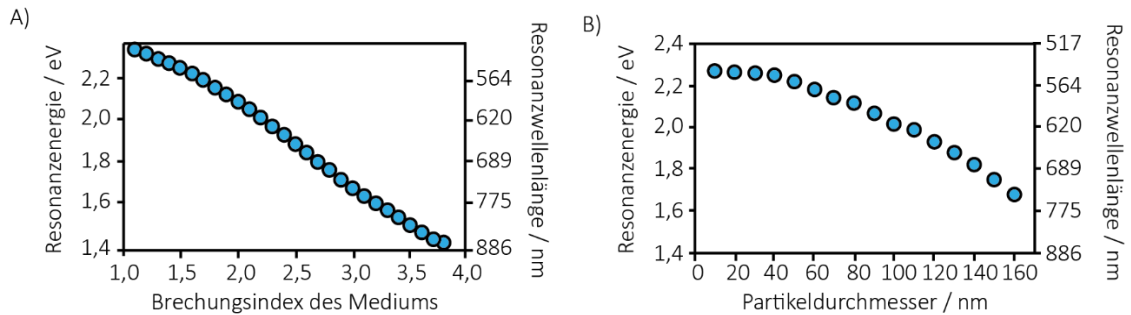


Abbildung 15: A) Einfluss des Brechungsindex des umgebenden Mediums auf die Resonanzenergie und die Breite des Streuspektrums eines Goldpartikels der Größe von 20 nm. B) Einfluss des Partikeldurchmessers auf die Resonanzenergie und die Breite des Streuspektrums von Gold-NP bei einem umgebenden Medium mit einem Brechungsindex von 1,5. Die Werte wurden von Carsten Sönnichsen mit der Mie-Theorie berechnet. [verändert nach C. Sönnichsen [43]].

Abgesehen davon, dass die Resonanz stark von der Partikelgröße und dem umgebenden Medium abhängig ist, gibt es auch eine Abhängigkeit zwischen der Form und der Resonanz. Mock et al. [52] zeigten in ihrer Veröffentlichung TEM-Aufnahmen von verschiedenen geformten Silber-NP und deren mit einem Dunkelfeldmikroskop aufgenommenen jeweiligen Streuspektren. In Abbildung 16 wurde ein dreieckiges NP ausgewählt, welches sich durch Aufheizen auf 200°C verformte bis ein sphärisches NP erreicht wurde. Aus den gemessenen Spektren wird ersichtlich, dass Silber-NP ähnlicher Größe eine starke Rot-Verschiebung erfahren je weiter sich die Form von einer Kugel entfernt.

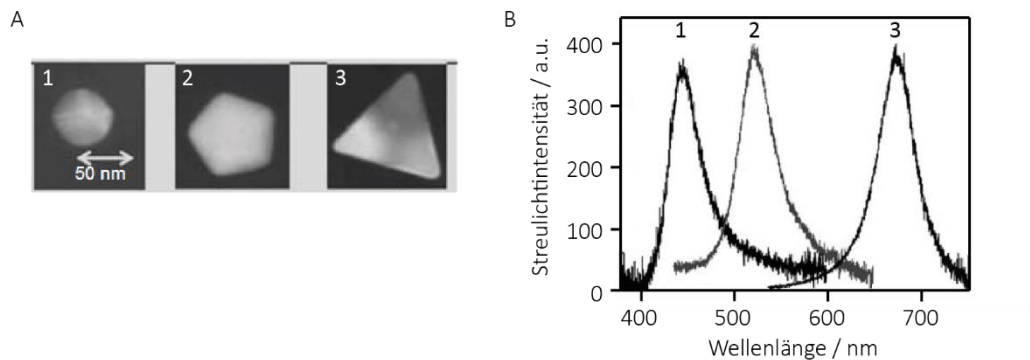


Abbildung 16: A) TEM-Aufnahmen von drei verschiedenen Silber-NP. B) Darstellung der gemessenen Streuspektren der Silber-NP aus (A), verändert nach [52]

Sönnichsen stellte in seiner Doktorarbeit eine einfache Gleichung basierend auf der Mie-Theorie vor, um von der Resonanzenergie im Streuspektrum einfach auf den Partikeldurchmesser rückschließen zu können, im Falle von sphärischen NP (für  $n = 1,5$ ):

$$d[\text{nm}] = 215 \sqrt{2,262 - E_{\text{res}}[\text{eV}]} \quad (20)$$

Für ein 100 nm großes Partikel entspricht dies einer Resonanzenergie von 2,05 eV, bzw. einer Resonanzwellenlänge von 606 nm.



### 2.2.4. Wechselwirkung zwischen zwei metallischen Nanopartikeln

Wenn zwei mNP sich sehr nahekomen (viel näher als die Resonanzwellenlänge), interagieren ihre lokalisierten Oberflächenplasmonen (LSP) miteinander über ihre optischen Nahfelder. Daraus entsteht eine gekoppelte LSPR Mode mit neuen Eigenschaften. Sind die mNP viel kleiner als die Wellenlänge des Lichts, kann die Kopplung zwischen den beiden mNP als Dipol-Dipol-Wechselwirkung angesehen werden. Dabei können die Dipole in Phase (bindend, Abbildung 17) und entgegen der Phase (antibindend, Abbildung 17) schwingen. Die optisch anregbaren Moden sind die bindenden Moden. Die bindende Mode ist für eine transversale Polarisation deutlich gegenüber der longitudinalen Polarisation bezüglich ihrer Energie erhöht. Damit ergeben sich zwei Resonanzen, bei der eine Rot-Verschiebung für die longitudinale Mode im Vergleich zum Monomer-Spektrum auftritt und die transversale Mode im Vergleich zur Monomer-Mode blau-verschoben ist. Die blau-Verschiebung ist im Vergleich zur Rot-Verschiebung weniger stark ausgeprägt.

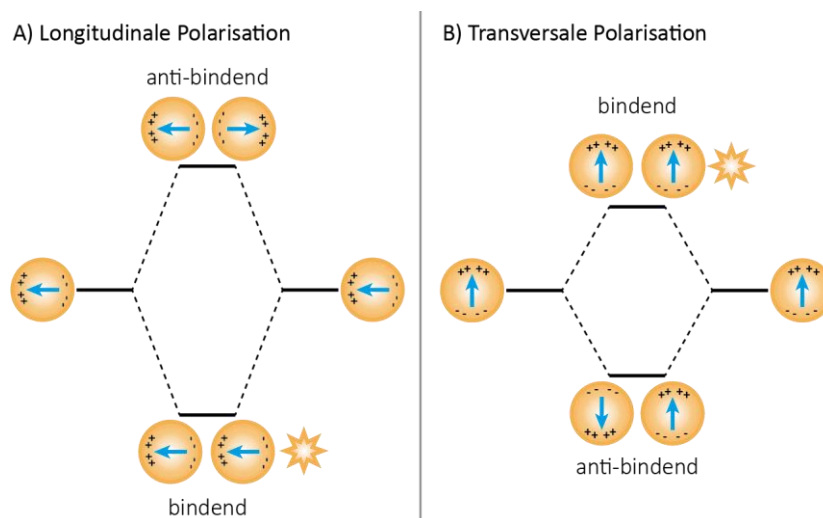


Abbildung 17: Darstellung der Hybridisierung der Plasmonen bei der Kopplung zweier identischer mNP für A) die longitudinale Polarisation und B) die transversale Polarisation. Bei der longitudinalen Polarisation befindet sich der Vektor des elektrischen Feldes parallel zum Verbindungsvektor zwischen den beiden mNP und bei der transversalen Polarisation senkrecht dazu. Die blauen Pfeile zeigen die Polarisationen der mNP an. Die Sterne markieren die Dipole, die optisch aktiv sind. Verändert nach [53].

### 2.2.5. Wechselwirkung zwischen Licht, metallischen Nanopartikeln und Farbstoffmolekülen

Wird ein mNP mit elektromagnetischer Strahlung beleuchtet, werden lokalisierte Oberflächenplasmonen ausgebildet. Dabei entsteht um das mNP ein verstärktes elektrisches Feld, welches am stärksten in der Nähe eines mNP ist (Abbildung 18 A). Das elektrische Feld um ein mNP ist evaneszent, was bedeutet, dass die Intensität an der Oberfläche maximal ist und nach außen hin kleiner wird. Die Abklinglänge entspricht etwa der halben Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes. Der Bereich in dem das elektrische Feld viel stärker ist als das des eingestrahnten Lichts wird „Hot Spot“ genannt.

Wir nehmen zunächst an, dass sich ein Farbstoffmolekül in unmittelbarer Nähe zu dem mNP befindet und seinen Dipol parallel zu dem elektrischen Feld ausgerichtet hat. In diesem Fall kommt es zu einer Wechselwirkung des mNP mit dem Farbstoff, die zu einer Änderung der Raten, die den angeregten Zustand des Farbstoffmoleküls  $S_1$  be- und entvölkern, führt. In Abbildung 18 B ist schematisch ein Jablonski-Diagramm dargestellt. Farbig sind die Raten, die durch die Nähe zum mNP eine Änderung erfahren, während in schwarz die Raten dargestellt sind, die konstant bleiben. Ob sich die Raten erhöhen

oder verringern ist abhängig von der Position und der Orientierung des Farbstoffmoleküls. Dies wird später in diesem Kapitel im Detail diskutiert. Die Änderung der Anregungsrate  $k_{\text{exc}}$  (oder auch Absorption) wird durch das zusätzliche elektrische Feld des mNP erzielt, vergleichbar mit einer Variation der Leistung der Strahlungsquelle. Die radiativen und nicht-radiativen Raten hingegen werden durch einen Energieübertrag vom Farbstoffmolekül auf das mNP verstärkt, durch den sich in dem mNP weitere Plasmonen ausbilden. Das mNP kann anschließend seine aufgenommene Energie in Form von Wärme abgeben oder Photonen aussenden. Die Wahrscheinlichkeit, dass das mNP Photonen aussendet hängt wiederum von seiner Größe ab. Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben steigt der Streuwirkungsquerschnitt stärker mit zunehmender Größe als der Absorptionswirkungsquerschnitt, so dass bei großen mNP die Streuung überwiegt und bei kleinen die Absorption. Die Übertragung der Energie vom Farbstoffmolekül auf das mNP erhöht also sowohl die radiative Rate, als auch die nicht-radiative Rate, abhängig von der Partikelgröße. Zudem ist die Übertragung der Energie von dem Farbstoffmolekül auf das mNP auch stark abstandsabhängig. Dies bedeutet, dass die nicht-radiative Rate viel stärker verstärkt wird als die radiative Rate, wenn der Abstand zwischen dem metallischen Partikel und dem Farbstoffmolekül verringert wird (siehe Abbildung 18 C).

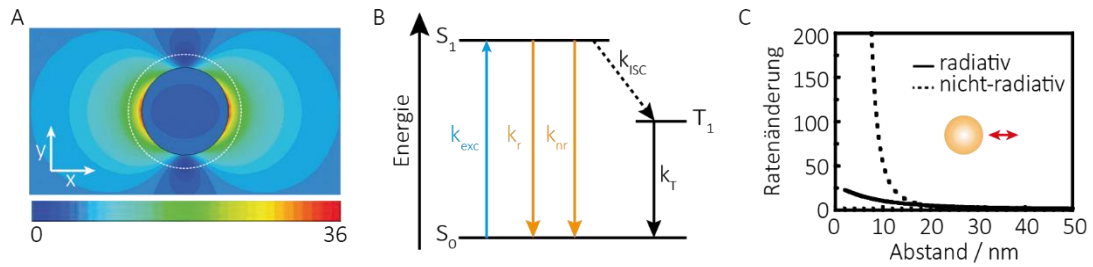


Abbildung 18: A) Intensität des elektrischen Feldes um ein 80 nm großes Gold-NP, übernommen aus [54]. Die gepunktete Linie stellt einen Abstand von 12,2 nm zur Oberfläche des Gold-NP dar. B) Vereinfachtes Jablonski-Schema für die Übergänge innerhalb eines Farbstoffmoleküls in unmittelbarer Nähe eines mNP. C) Änderung der radiativen und der nicht-radiativen Rate in Abhängigkeit vom Abstand zwischen einem 80 nm großen Gold-NP und einem Farbstoffmolekül berechnet nach Gleichung (24) [55].

Um die Änderung der Raten im Detail zu betrachten, wird das Farbstoffmolekül im Folgenden als klassischer Dipol betrachtet, dessen Dipolmoment parallel zum elektrischen Feld orientiert ist.

Die Fluoreszenzrate eines Farbstoffmoleküls  $k_{\text{Fl}}$  ist das Produkt aus der Anregungsrate  $k_{\text{exc}}$  und der Quantenausbeute  $Q$ .

$$k_{\text{Fl}} = k_{\text{exc}} \cdot Q \quad (21)$$

Befindet sich ein mNP in der Nähe des Farbstoffs, so kann die Fluoreszenz entweder verstärkt oder verringert werden. Die Änderung der Fluoreszenz  $X$  ist der Faktor, um den die Anzahl an Photonen pro Zeiteinheit  $k_{\text{Fl}}^{\text{NP}}$  divergiert im Vergleich zum reinen Farbstoff  $k_{\text{Fl}}$ :

$$k_{\text{Fl}}^{\text{NP}} = X \cdot k_{\text{Fl}} \quad (22)$$

Damit ergibt sich:

$$X = \frac{k_{\text{Fl}}^{\text{NP}}}{k_{\text{Fl}}} = \frac{k_{\text{exc}}^{\text{NP}} \cdot Q^{\text{NP}}}{k_{\text{exc}} \cdot Q} \quad (23)$$

Solange sich das Farbstoffmolekül nicht in Sättigung befindet ist die Anregungsrate proportional zu dem lokalen elektrischen Feld ( $k_{\text{exc}} \sim |p \cdot E|^2$ ). Somit ist die Änderung der Anregungsrate  $k_{\text{exc}}^{\text{NP}}/k_{\text{exc}}$  am größten in der direkten Umgebung des mNP.

Für einen Farbstoff, dessen Dipolmoment parallel zum E-Feld der Anregung ausgerichtet ist, sind die Verstärkung der Anregungsrate und der radiativen Rate identisch. Zu beachten ist aber, dass obwohl beide Raten die gleiche Form aufweisen ein Unterschied in der Frequenz  $\omega$  für die Absorption bzw. Emission auftreten kann [55].

$$\frac{k_{\text{exc}}^{\text{NP}}}{k_{\text{exc}}} = \frac{k_{\text{rad}}^{\text{NP}}}{k_{\text{rad}}} = \left| 1 + 2 \frac{R^3}{(R+z)^3} \frac{\varepsilon(\omega) - 1}{\varepsilon(\omega) + 2} \right|^2 \quad (24)$$

$R$  ist der Radius des mNP, und  $z$  der Abstand zwischen dem mNP und dem Farbstoff.

Damit liegt die maximale Verstärkung für die Anregungsrate und die radiative Rate bei einem Abstand von  $z = 0$ . Beide Raten sind abhängig von dem Radius des mNP  $R$  und dessen Materialeigenschaften  $\varepsilon(\omega)$ . In Abbildung 19 A ist die Anregungsrate in Abhängigkeit vom Abstand aufgetragen (rot).

Die intrinsische Quantenausbeute eines Farbstoffmoleküls ist der Anteil an durch Strahlung abgegebener Energie im Verhältnis zur Summe aller Raten, die den angeregten Zustand entvölkern (Gleichung (4)). Befindet sich ein mNP in unmittelbarer Nähe zu einem Farbstoff, so wird auch die Quantenausbeute geändert. Dies kommt sowohl durch eine Verstärkung der radiativen Rate  $k_{\text{rad}}^{\text{NP}}$ , als auch durch die Einführung einer zusätzlichen nicht-radiativen Rate  $k_{\text{abs}}^{\text{NP}}$  zustande.

$$Q^{\text{NP}} = \frac{k_{\text{rad}}^{\text{NP}}}{k_{\text{rad}}^{\text{NP}} + k_{\text{nr}}^{\text{NP}} + k_{\text{abs}}^{\text{NP}}} \quad (25)$$

Durch Einsetzen von der Definition für die Quantenausbeute des Farbstoffmoleküls (4) ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$Q^{\text{NP}} = \frac{\frac{k_{\text{rad}}^{\text{NP}}}{k_{\text{rad}}}}{\frac{k_{\text{rad}}^{\text{NP}}}{k_{\text{rad}}} + \frac{k_{\text{abs}}^{\text{NP}}}{k_{\text{rad}}} + \frac{(1-Q)}{Q}} \quad (26)$$

Der Energietransfer vom Farbstoff auf das mNP im Vergleich zur radiativen Rate des Farbstoffmoleküls wurde von Bharadwaj et al. [55] definiert zu:

$$\frac{k_{\text{abs}}^{\text{NP}}}{k_{\text{rad}}} = \frac{3}{16} \cdot \text{Im} \frac{\varepsilon(\omega) - 1}{\varepsilon(\omega) + 1} \frac{1}{k^3 z^3} \quad (27)$$

$z$  ist der Abstand zwischen dem Farbstoff und dem mNP und  $k$  ist der Wellenvektor ( $k = 2\pi/\lambda$ ).

Für einen Farbstoff mit einer sehr großen intrinsischen Quantenausbeute ( $Q \sim 1$ ) wirkt sich dies in einer bei kürzerem Abstand kleiner werdenden Quantenausbeute aus (siehe Abbildung 19 A, blau). Für einen Farbstoff mit niedriger Quantenausbeute erhöht sich die Quantenausbeute zunächst bei kürzer werdendem Abstand, bis sie bei unter 15 nm wieder sinkt [45]. Das Produkt aus der Anregungsratenänderung und der Quantenausbeuten ergibt die Änderung der Fluoreszenzrate (siehe Abbildung 19 B). In Abbildung 19 B ist die Fluoreszenzrate in Abhängigkeit von dem Abstand für unterschiedliche

Gold-Nanopartikelgrößen dargestellt. Die Fluoreszenzrate steigt mit kürzer werdendem Abstand zwischen dem Gold-NP und dem Farbstoff stark an, bis ein Abstand erreicht ist, ab dem die zusätzlichen nicht-radiativen Raten einen größeren Einfluss auf den Farbstoff ausüben, als die Verstärkung der radiativen Rate und so die Fluoreszenzrate drastisch sinkt. In der Abbildung 19 B ist weiterhin zu sehen, dass die Fluoreszenzverstärkung mit zunehmendem Durchmesser des mNP zunimmt. In Abbildung 19 C und D ist ferner die Abhängigkeit der Fluoreszenzverstärkung von der Anregungswellenlänge und dem Abstand für 80 nm große Silber- (blau) und Gold-NP (rot) dargestellt. Es zeigt sich, dass Silber eine viel größere Fluoreszenzverstärkung bewirkt, und stärker im blauen bis UV-Bereich aktiv ist. Gold hingegen verstärkt die Fluoreszenz besser im roten Bereich des Spektrums. Der Pfeil in Abbildung 19 C zeigt die eigentliche Resonanzfrequenz von 80 nm großen Gold-NP ( $\lambda \sim 530$  nm). Die maximale Verstärkung ist jedoch rot-verschoben ( $\lambda \sim 630$  nm). Der gleiche Fall ist auch für Silber zu beobachten, welches die Resonanzfrequenz bei  $\lambda \sim 360$  nm hat und eine maximale Verstärkung im blauen Bereich zeigt. Dies zeigt, dass ein Farbstoff idealerweise ein rot-verschobenes Absorptions-/Emissionsspektrum haben sollte, im Vergleich zur Resonanzfrequenz des verwendeten mNP, um eine maximale Fluoreszenzverstärkung zu erreichen.

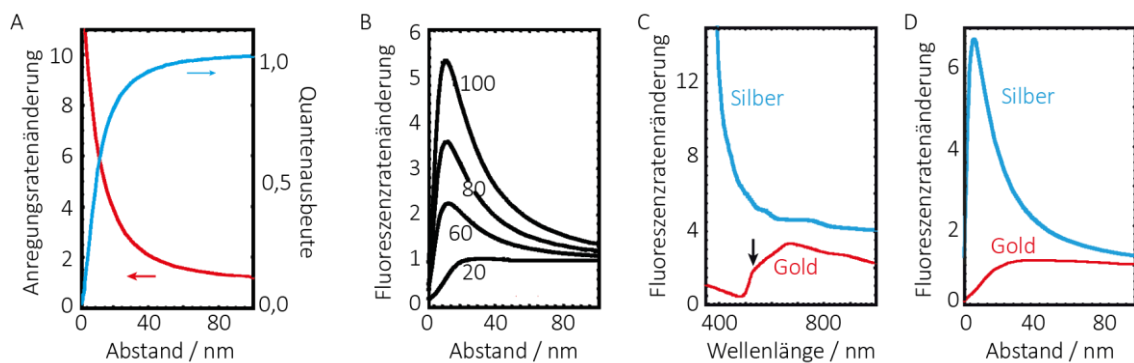


Abbildung 19: A) Anregungsratenverstärkung (rot) und Quantenausbeute (blau) als Funktion des Abstands zwischen einem 80 nm großen Gold-NP und einem Farbstoff mit einer Quantenausbeute von 1. B) Verstärkung der Emissionsrate als Funktion des Abstands für unterschiedliche Durchmesser der Gold-NP. Anregungswellenlänge liegt bei 650 nm. C) Fluoreszenzverstärkung für Silber und Gold (je 80 nm) in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei einem Abstand von 10 nm zwischen dem Partikel und dem Farbstoff. D) Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von dem Abstand bei einer festen Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Quantenausbeute des Farbstoffmoleküls beträgt in allen vier Graphen  $Q \sim 1$ . Abbildungen verändert nach [25, 55].

Nachdem zuvor der Idealfall diskutiert wurde, in dem das Farbstoffmoleküloptimal zum mNP und zu dessen elektrischen Feld orientiert ist (siehe Abbildung 20 A), sollen nun auch mögliche andere Orientierungen und deren Auswirkungen auf die Fluoreszenz betrachtet werden. Härtling et al. haben in ihrer Veröffentlichung aus dem Jahr 2007 unterschiedliche Dipol-mNP-Orientierungen untersucht [56]. Wenn das Dipolmoment des Farbstoffmoleküls nicht parallel, sondern senkrecht zum elektrischen Feld orientiert ist, wie in Abbildung 20 B dargestellt, ist die Anregungsrate stark verringert und die Fluoreszenzrate ebenso. Befindet sich das Farbstoffmolekül jedoch in Ausbreitungsrichtung des Anregungslichtes und ist parallel zum elektrischen Feld polarisiert, so nimmt die Anregungsrate ab, bis sie nahe am mNP wieder ansteigt. Dies hat zur Folge, dass die Fluoreszenzrate abnimmt, da auch hier bei niedrigen Abständen die nicht-radiativen Raten überwiegen. Befindet sich das Farbstoffmolekül oberhalb des mNP, ist ein ähnlicher Effekt zu beobachten (Abbildung 20 D).

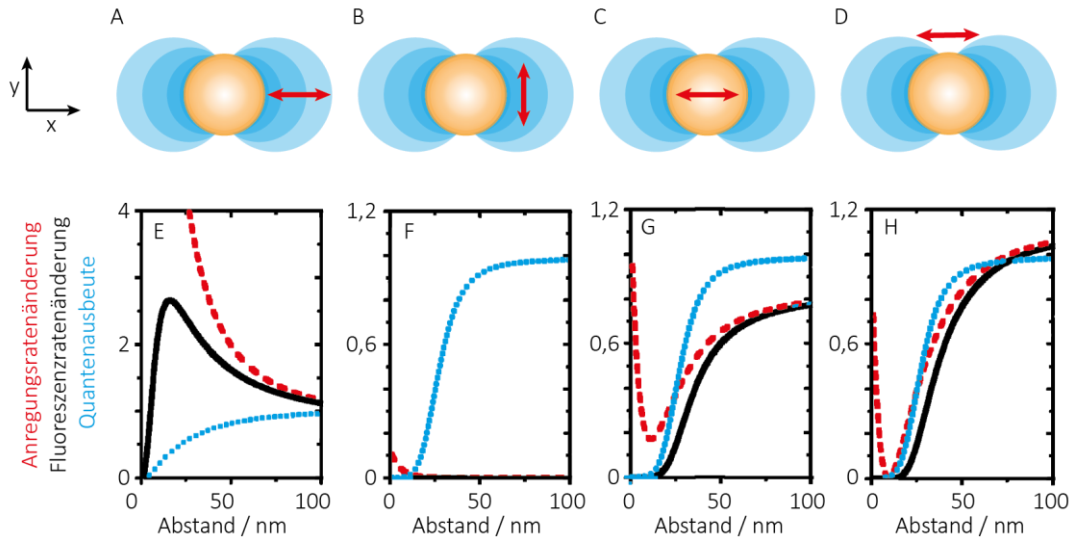


Abbildung 20: Normierte Anregungsratenänderung (rot, gepunktet), normierte Fluoreszenzratenänderung (schwarz) und Quantenausbeute (blau, gepunktet) in Abhängigkeit vom Abstand zwischen einem 80 nm großen Gold-NP und einem Dipol (Farbstoff) mit  $Q=1$ . Die Anregungswellenlänge ist  $\lambda_{exc}=532$  nm und die Dipolemission bei ist  $\lambda_{em}=560$  nm. A-C) stellen die unterschiedlichen Orientierungen des Dipols zum elektrischen Feld um das Gold-NP dar. Y ist die Ausbreitungsrichtung des Lichts und x die Richtung des elektrischen Feldes. verändert nach [56].

Da auch die Fluoreszenzlebensdauer abhängig von den radiativen und nicht-radiativen Raten ist, welche bei kürzerem Abstand zum mNP steigen, sinkt die Fluoreszenzlebensdauer in Anwesenheit von mNP:

$$\tau_{Fl}^{NP} = \frac{1}{k_{rad}^{NP} + k_{nr}^{NP} + k_{abs}^{NP}} \quad (28)$$

Durch Einsetzen der Quantenausbeute ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\frac{\tau_{Fl}^{NP}}{\tau_{Fl}} = \frac{k_{rad}^{NP} \cdot Q}{k_{rad} \cdot Q^{NP}} \quad (29)$$

Da das Farbstoffmolekül in der Nähe von mNP kürzer im angeregten Zustand ist, kann er zum einen mehr Photonen aussenden, da es schneller wieder angeregt werden kann, und zum anderen ist das Photobleichen reduziert, da die Reaktion von beispielsweise Sauerstoff mit dem angeregten Zustand und auch mit dem Triplett-Zustand verringert wird.

## 2.3. Biologische Grundlagen

### 2.3.1. DNA

Den Grundstein der DNA-Nanotechnologie legte 1982 Nadrian Seeman in seinem Beitrag „Nucleic acid junctions and lattices“ [57], in dem er beschrieb, dass es möglich sein muss, Strukturen aus DNA zu konstruieren. Für diese vorgestellten Gitterstrukturen sollten DNA-Kreuzungen (Junctions) verwendet werden, wie beispielsweise Holliday Junctions. DNA (Desoxyribonukleinsäure, DNS) hat verglichen mit anderen Biomolekülen eine sehr einfache Struktur und kann gezielt hergestellt werden. Die Hauptbausteine der DNA bilden vier Nukleotide, die wiederum jeweils aus einem Phosphat, einem Zucker (Desoxyribose) und einer Base (Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin) aufgebaut sind (siehe Abbildung 21 A). Die Basen Adenin und Thymin, bzw. Guanin und Cytosin binden über Wasserstoffbrücken aneinander und sorgen so für die Spezifität der Bindung von DNA. Die DNA wird durch die hydrophobe Wechselwirkung von benachbarten Basen stabilisiert, die zu einer Stapelung der Basen führt (Stapelwechselwirkungen). Die Stärke der Wechselwirkung ist bei der Kombination Guanin-Cytosin am höchsten, während Thymin-Adenin die schwächste Stapelung aufweist. Das Phosphat bildet zusammen mit dem Zucker das Rückgrat der DNA, welches aufgrund der negativen Ladungen der Phosphate in wässrigem Milieu insgesamt eine negative Ladung hat. Das 1'-Kohlenstoffatom der Desoxyribose bindet an die Base, während an der 3'-Position die OH-Gruppe sitzt und an das 5'-Kohlenstoffatom das Phosphat anbindet. So wird jedes Ende eines DNA-Stranges mit 3'-, bzw. 5'-Ende gekennzeichnet. Diese Bezeichnung ist essentiell, da DNA-Polymerasen immer nur an das 3'-Ende neue Nukleotide hinzufügen können. Die in dieser Arbeit relevante Doppelhelix ist die rechtsdrehende B-DNA, bei der das 3'-Ende des einen Strangs sich mit dem 5'-Ende des zweiten Strangs verbindet (siehe Abbildung 21 B). Der Durchmesser der Helix liegt bei etwa zwei Nanometern und der Abstand zweier Basen liegt bei etwa 0,34 nm, was eine komplette Drehung der DNA nach 3,6 nm (1 Windung = 10,5 Basenpaare) ergibt.

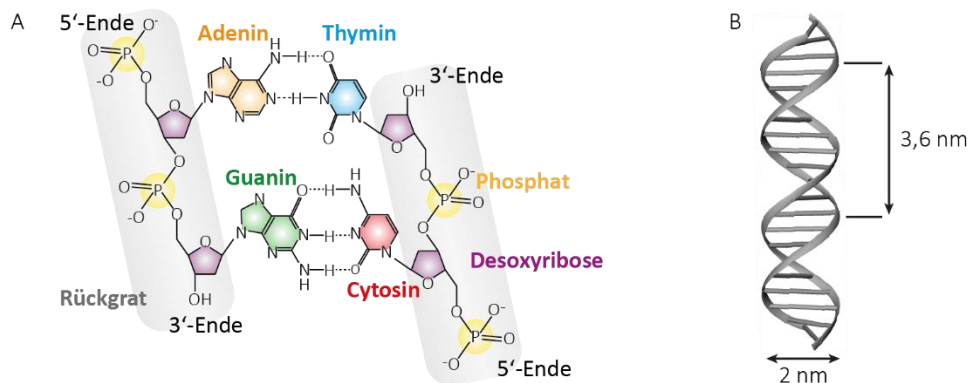


Abbildung 21: A) Darstellung der einzelnen Komponenten einer DNA-Doppelhelix. B) Abstände in einem DNA-Strang.

Die DNA ist ein Makromolekül, das mit Farbstoffmolekülen an jeder ihrer Basen markiert werden kann. In erster Näherung kann der Abstand zwischen diesen über die Anzahl der zwischen ihnen liegenden Basen berechnet werden, multipliziert mit dem Faktor 0,34 nm. Dies gilt jedoch nur für den Fall, dass die Farbstoffmoleküle sich in der gleichen Ebene befinden, also ihr Abstand 10,5·N beträgt (N = Anzahl der Basen). Aus Abbildung 22 wird jedoch ersichtlich, dass aufgrund der Windung der Helix die Abstände stark von der Position entlang der Windung abhängen. Hierfür wird ein neues Modell zur Berechnung des Abstands benötigt.

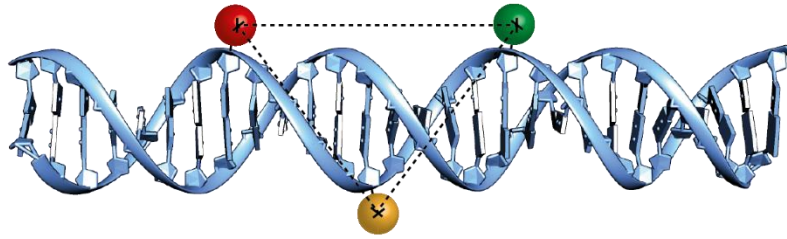


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Abstände der Farbstoffmoleküle in Abhängigkeit von ihrer Position auf der DNA. Der Abstand zwischen dem roten und dem grünen Molekül wird gut über  $0,34 \cdot N$  angenähert wohingegen der Abstand zum gelben Molekül deutlich weiter ist aufgrund der Windung der Doppelhelix.

In Abbildung 23 A ist ein Zylinder-Modell beschrieben, mit dem der Versatz der Farbstoffmoleküle auf der Helix dargestellt wird. Die Farbstoffmoleküle haben zunächst den beschriebenen Abstand von  $N \cdot 0,34$  nm zueinander. Hinzu kommt die Projektion des Farbstoffmoleküls auf die helikale Achse  $L$ . Dies ist der Versatz zwischen den beiden Farbstoffmolekülen, wenn sie an der gleichen Base sitzen würden. Somit kann  $L$  positive und negative Werte annehmen.  $a$  und  $d$  stellen die Distanzen der Mittelpunkte der Farbstoffmoleküle von dem Mittelpunkt der Doppelhelix dar. Diese setzen sich aus der Linkerlänge und der Größe der Farbstoffmoleküle zusammen. Der Durchmesser eines Farbstoffmoleküls liegt zwischen 1 und 1,5 nm und die Linkerlänge bei etwa 1,2 bis 2,1 nm. Der Winkel um den die beiden Farbstoffmoleküle aufgrund der Helix-Windung zueinander versetzt sind, wird auf die Windungslänge von 10,5 normiert. Der Winkel  $\theta$  beschreibt den Winkel, den die beiden Farbstoffmoleküle einnehmen, wären sie am selben Basenpaar verankert. Befinden sie sich auf der gleichen Helix beträgt  $\theta = 0^\circ$ . Sind sie auf unterschiedlichen Helices beträgt  $\theta = \pi$ , bzw.  $\theta = 360^\circ$ .

$$R = \sqrt{(0,34 \text{ nm} \cdot N + L)^2 + (d \cdot \sin \theta)^2 + (a - d \cdot \cos \theta)^2} \quad (30)$$

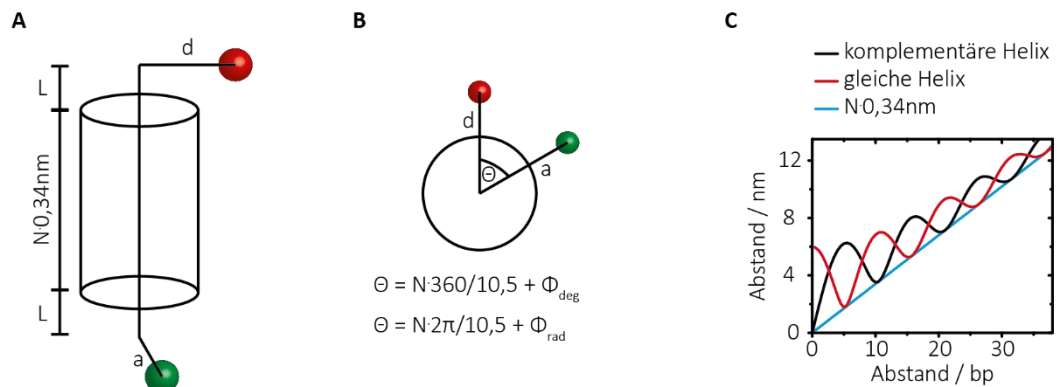


Abbildung 23: A und B) Zylinder-Modell zur Berechnung des Abstands zweier Farbstoffmoleküle an einem DNA-Strang. C) Berechneter Abstand zwischen den beiden Farbstoffmolekülen in Bezug auf die Anzahl an Basenpaaren zwischen den Farbstoffmolekülen. Die blaue Gerade ist der einfache Zusammenhang  $N \cdot 0,34$  nm, wohingegen die schwarze und die rote Kurve die Abstände berechnet mit dem Zylinder-Modell darstellen.

In Abbildung 23 C ist deutlich der Unterschied zwischen dem Zylinder-Modell (schwarz, rot) und der vereinfachten Annahme, dass der Abstand  $N \cdot 0,34$  nm (blau) beträgt zu sehen. Insgesamt wird so bei der linearen Betrachtung der Abstand in den meisten Fällen deutlich unterschätzt.

### 2.3.2. Holliday Junction

Die im Jahr 1964 von dem Genetiker Robin Holliday postulierte Kreuzung aus vier DNA-Armen (Holliday Junction) tritt bei der homologen Rekombination auf [58]. Bei dieser werden genetische Informationen zwischen zwei DNA Strängen ausgetauscht, wobei die Holliday Junction ein wesentlicher Zwischenschritt ist. Sie besteht aus zwei bzw. vier DNA-Stücken, die durch Hybridisieren eine kreuzförmige Struktur bilden. Bei niedrigen Salzkonzentrationen liegt sie in einer offenen quadratischen Form vor, bei der die Arme einen maximalen Abstand zueinander aufweisen (Abbildung 24, Mitte). Die Phosphate der vier Basen innerhalb der Kreuzung sorgen für eine starke negative Ladung, die zu der quadratischen Form führt. Auf diese Weise wird die elektrostatische Abstoßung minimiert. Wird nun die Konzentration an zweiwertigen Metallionen erhöht ( $>50\mu\text{M}$  [59]), so kommt es zur coaxialen Stapelung der Arme. Dabei sind zwei Konformationen möglich (Iso-I und Iso-II, Abbildung 24), die dynamisch zwischen einander wechseln, mit dem offenen quadratischen Zustand als Übergangszustand. Die Metallionen sorgen dafür, dass die elektrostatische Abstoßung der Phosphate verringert wird und die Stapelwechselwirkungen überwiegen. Bei den Konformeren Iso-I und Iso-II wird in erster Linie abhängig von den vier Basen in dem Kreuzungsbereich eine Konformation bevorzugt. Es gibt jedoch auch Sequenzen, bei denen eine Gleichverteilung vorliegt. Einen zusätzlichen Einfluss darauf hat außerdem die gesamte Sequenz der Holliday Junction. Durch ein Markieren zweier Arme der Holliday Junction mit jeweils einem Donor- und einem Akzeptormolekül kann die Dynamik bei Zugabe von Magnesiumchlorid beobachtet werden. 1983 beschrieb Nadrian Seeman [60] eine Holliday Junction, die durch hybridisieren von vier einzelnen, synthetisch hergestellten DNA-Strängen hergestellt wurde. Dies, und seine Überlegungen aus den Holliday Junctions Gitterstrukturen zu bauen [57], legten den Grundstein für die DNA-Nanotechnologie.

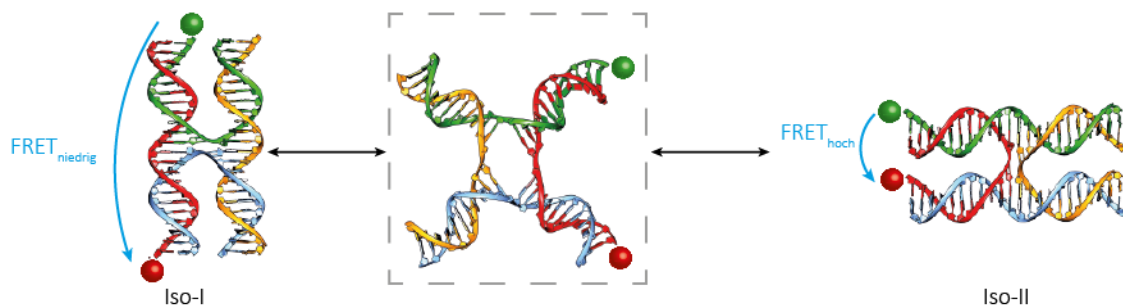


Abbildung 24: Die zwei Konformere der Holliday Junction, die bei Magnesiumchlorid über den offenen quadratischen Zustand dynamisch ihre Konformation wechseln.

### 2.3.3. DNA-Origami

Bei der DNA-Nanotechnologie wird es sich zunutze gemacht, dass zwei DNA-Einzelstränge nur dann eine stabile Bindung eingehen, wenn ihre Sequenzen komplementär sind. Dies führt zu einer hohen Spezifität der Assemblierung. Da doppelsträngige DNA eine Persistenzlänge von etwa 150 Basenpaaren [61, 62], also etwa 54 nm hat, fungiert sie als idealer Baustein auf der Nanoebene.

Im Jahr 2006 entwickelte schließlich Paul Rothemund eine Methode, bei der anders als zuvor nicht viele zueinander komplementäre Einzelstränge zu einer Struktur hybridisiert werden, sondern ein langer zirkulärer Einzelstrang ( $\sim 7000$  bp) durch viele kürzere (20-60 bp) Stränge in Form gefaltet wird [12]. Das erhaltene Konstrukt wird DNA-Origami genannt, angelehnt an die japanische Kunst des Papierfaltens. Der größte Vorteil dieser Technik ist, dass nun keine genauen Stöchiometrien



mehr nötig waren, da die Klammerstränge nur an die komplementären Bereiche des Gerüststrangs anbinden. Daher ist eine sehr hohe Ausbeute zu verzeichnen, da die Klammerstränge in einem hohen Überschuss hinzugegeben werden und durch Strangverdrängungsreaktionen falsch angebundene Stränge verdrängt werden. Zudem hat dies auch den Vorteil, dass die Klammerstränge nicht durch mehrere zeitintensive Arbeitsschritte gereinigt werden mussten, da Stränge falscher Sequenzen durch den Überschuss an korrekten Strängen ausgetauscht werden. Hat erstmal ein Klammerstrang an zwei oder mehreren Bereichen des Gerüststrangs angebunden und diesen vorgefaltet, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein zweiter Strang direkt an die komplementären Sequenzen anbindet. Dies hat zur Folge, dass die Synthese deutlich schneller vonstattengeht. Der Gerüststrang ist meistens dem Bakteriophagen M13mp18 entnommen und beinhaltet 7249 Nukleotide. Die Form des DNA-Origami wird nur durch die Wahl der Klammerstränge bestimmt. Bei dem DNA-Origami ist jede Helix mit ihren beiden benachbarten Helices über Kreuzungspunkte (Holliday Junctions) verbunden, die alle 16 Basenpaare auftreten. Dies führt zu einem Winkel von  $180^\circ$  zwischen benachbarten Helices (Abbildung 25C).

Die von Rothemund vorgestellten DNA-Origami konnten aufgrund ihrer Flexibilität nur als planare zweidimensionale Strukturen synthetisiert werden. Um den Zugang zu dreidimensionalen Objekten zu finden, wurde von Douglas et al. 2009 [63] eine Erweiterung der DNA-Origami-Technik vorgestellt, indem sie jede Helix nicht mit zwei Nachbarhelices verknüpften, sondern mit drei solchen über Kreuzungspunkte im Abstand von sieben Basenpaaren. Dies ergibt einen Winkel von  $120^\circ$ , verglichen mit dem 2D-DNA-Origami, und so eine Bienenwabenstruktur (Abbildung 25C). Da sich die Komplexität des DNA-Origamis mit steigenden Anforderungen erhöht, entwickelten Shih et al. [64] außerdem ein Computerprogramm (caDNAano), das den Prozess des Modellierens vereinfacht, indem nur die gewünschte Struktur erarbeitet wird und das Programm auf Grundlage des gewählten Gerüststrangs die passenden Klammerstränge berechnet. Um schließlich noch mehr Formenvielfalt zu erreichen, zeigten Dietz et al. 2009 [65], dass das Entfernen oder Hinzufügen von Basen zwischen zwei benachbarten DNA-Kreuzungen zu einem Verkrümmen und Verdrehen des DNA-Origamis führen.

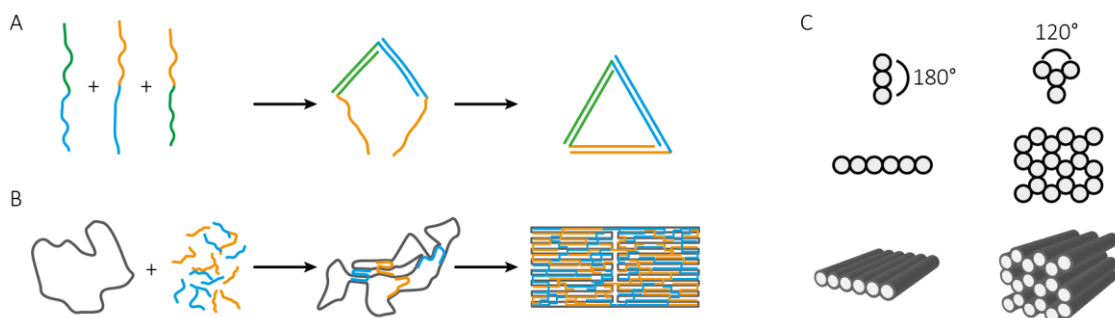


Abbildung 25: A) Synthese einer dreieckigen DNA-Struktur aus drei gleichlangen DNA-Sequenzen. B) Synthese eines DNA-Origamis am Beispiel eines Rechteckigen DNA-Origamis. Zunächst werden der Gerüststrang und die Heftstränge in einem Mikroreaktionsgefäß gemischt und erhitzt. Beim Abkühlen binden die Heftstränge an den komplementären Bereich des Gerüststranges. C) Aufbau eines zweidimensionalen DNA-Origamis nach P. Rothemund [12] und eines dreidimensionalen DNA-Origamis nach S. Douglas [63].

Da es viele etablierte Methoden gibt DNA zu modifizieren und die modifizierten Stränge leicht durch Hybridisierung an das DNA-Origami angebunden werden können, gibt es eine Vielzahl an Varianten, Partikel (Farbstoffmoleküle, Proteine, usw.) in einem bekannten Abstand und einer bekannten Ausrichtung auf dem DNA-Origami anzuordnen und zu manipulieren. Dies erlaubt es das DNA-Origami als molekulares Steckbrett im Nanometermaßstab anzusehen.

#### 2.3.4. Archaeelles TATA-Box-bindendes Protein

Das archaelle TATA-Box-bindende Protein (TBP) ist ein basaler Transkriptionsfaktor, der spezifisch an eine etwa acht basenpaar lange DNA-Sequenz aus Thymin und Adenin anbindet, der sogenannten TATA-Box (auch Goldberg-Hogness-Box). Es besteht aus zehn  $\beta$ -Faltblättern und vier  $\alpha$ -Helizes, die eine sattelförmige Struktur ausbilden (siehe Abbildung 26). Beim Binden des TBPs an die DNA verbiegt es diese, indem es über die Phenylalanine in die kleineren Vertiefungen der DNA zwischen den beiden ersten und den beiden letzten zwei Basenpaaren der TATA-Box bindet. Dabei weitet sich die DNA-Doppelhelix auf und knickt um etwa  $90^\circ$  in die Richtung der größeren Vertiefung der TATA-Box [66, 67]. Obwohl das TBP die DNA knickt, ändert es seine eigene Struktur kaum. Die Oberfläche des TBPs besteht aus vielen Säureresten und einem Überschuss an elf negativ geladenen Aminosäuren, während die Anbindebereiche des TBPs aus überwiegend neutralen Aminosäuren bestehen, die eine hydrophobe Wechselwirkung mit den Basen der DNA eingehen. Die negativ geladene Oberfläche des Proteins hat zur Folge, dass eine Abstoßung zwischen der DNA und dem Protein vorliegt, daher werden hohe Salzkonzentrationen verwendet, um die Oberfläche zu neutralisieren [2]. Das Aufdrehen und Knicken der DNA ist ein simultan ablaufender dynamischer Vorgang, der in der Dissertation von A. Gietl [2] anhand von Einzelmolekülmessungen bereits dargestellt wurde.

An das TBP bindet anschließend der Transkriptionsinitiationsfaktor B (TFB). Dieser Komplex ist notwendig, um die RNA-Polymerase an die DNA zu rekrutieren und so den Pre-Initiationskomplex zu bilden. Ohne die Transkriptionsfaktoren würde die Polymerase nicht ihre Arbeit an der DNA verrichten können.

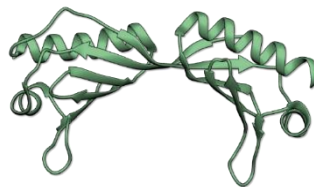


Abbildung 26: Darstellung der Kristallstruktur des TATA-Box bindenden Proteins (TBP): Protein Database (2Z8U).

### 3. Material und Methoden

Dieses Kapitel beinhaltet die verwendeten Mikroskope, die Auswertung, sowie die Probenherstellung und -vorbereitung,

#### 3.1. Mikroskop-Aufbau

Die Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie ist eine Methode, die dazu dient einzelne fluoreszierende Farbstoffmoleküle zu untersuchen. Im Gegensatz zu Ensemble-Messungen (z.B. im Fluoreszenzspektrometer) wird kein Mittelwert über alle Moleküle einer Probe gebildet, sondern jedes Molekül einzeln und ortsabhängig auf sein Fluoreszenzverhalten hin untersucht. Auf diese Weise können beispielsweise Dynamiken und Subpopulationen innerhalb einer Probe erkannt werden, die bei Ensemble-Messungen durch Mittelwertbildung entfallen würden. Typische Messtechniken sind konfokale Fluoreszenzmikroskopie und TIRF-Mikroskopie (totale interne Reflexion), bei denen durch Verdünnen der Probe bis in den pikomolaren Bereich einzelne Moleküle sichtbar gemacht werden.

Bei der Dunkelfeld-Mikroskopie wird die Probe so beleuchtet, dass nur das Streulicht der Probe detektiert wird, während das Anregungslicht durch eine Iris blockiert wird. Hier ist auch eine Einzelmoleküldetektion möglich, wenn die zu untersuchende Probe bis in den mikromolaren Bereich verdünnt wird.

##### 3.1.1. Das kombinierte Fluoreszenzmikroskop

Der für Teile dieser Arbeit neu entstandene Mikroskop-Aufbau ist in Abbildung 27 vereinfacht dargestellt. Bei früheren Messungen zeigte sich die Notwendigkeit, das bestehende Einzelmolekülfluoreszenzmikroskop um eine Dunkelfeldmikroskopie-Einheit mit integrierter hyperspektraler Auflösung zu erweitern.

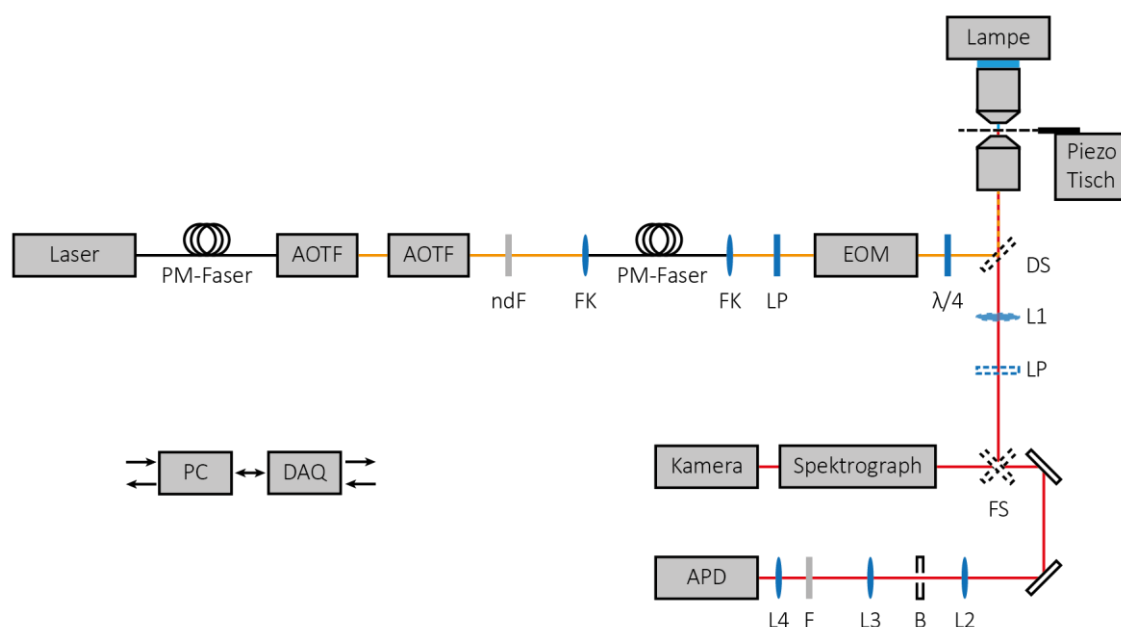


Abbildung 27: Vereinfachte Darstellung des Mikroskop-Aufbaus für zeitaufgelöste Einzelphotonenmessungen, sowie Dunkelfeld-Spektroskopie. PM: polarisationserhaltende Faser, ndF: Neutraldichtefilter, FK: Fasereinkoppler, LP: Linearpolarisator, DS: Dichroitischer Strahlenteiler, L: Linse, F: Filter, B: Lochblende, EOM: elektro-optischer Modulator, AOTF: akusto-optischer Filter

Für die Fluoreszenzmessungen wird ein gepulster Weißlichtlaser mit einer Frequenz von 78 MHz verwendet (EXW-12 SuperK Extreme, NKT Photonics, Dänemark). Der spektral-abrufbare Bereich liegt bei 400 bis 2400 nm, welcher ein breites Anwendungsspektrum ermöglicht (siehe Abbildung A 10). In dieser Arbeit wird eine Wellenlänge von 640 nm gewählt, um ideal den Farbstoff Atto647N anregen zu können. Die Auswahl der Wellenlängen erfolgt über einen akusto-optisch abstimmbaren Filter (AOTF, SuperK Dual AOTF, NKT Photonics, Dänemark). Dieser wird über einen digitalen Regler (AODS 20160 8R, Crystal Technology, Inc., USA) angesteuert, mit dem Wellenlängen in einem Bereich zwischen 400 und 700 nm über eine Computer-Software (AODS 20160 Control Panel, Crystal Technology, Inc. USA) ausgewählt werden können. Ein zweiter AOTF (AA.AOTF.ns:TN, AA-Opto-Electronic, Frankreich) kann verwendet werden um bei Bedarf mehrere Wellenlängen zu alternieren, die Intensität des Lasers zu regeln, sowie auch um den Laserstrahl weiter spektral zu reinigen. Die Ansteuerung erfolgt über eine in LabVIEW geschriebene Software (AOTFcontrol.exe).

Ein AOTF besteht aus einem doppelbrechenden Kristall, dessen optische Eigenschaften sich durch Wechselwirkung mit einer akustischen Welle im Radiofrequenzbereich verändern lassen. Je nachdem welche Frequenz von außen angelegt wird, wird eine bestimmte Wellenlänge durch den Kristall gebeugt. Dieser Strahl erster Ordnung wird weitergeleitet, während der Strahl nullter Ordnung, also der Input-Laserstrahl, durch eine Strahlfalle gestoppt wird.

Ein variabler Neutraldichte-Filter (ndF, OD 0-2, Thorlabs) wird verwendet um die Intensität des Laserstrahls optimal in einem niedrigen Intensitätsbereich (0,2 bis 20  $\mu\text{W}$ ) variieren zu können. Der Laserstrahl wird in eine polarisationserhaltende Faser (PM-Faser, P1-488PM-FC-2, Thorlabs, Deutschland) eingekoppelt um den Höhenunterschied zwischen dem Anregungslaser und dem Mikroskop-Körper zu überwinden. Ein Linearpolarisator (LP, LPVISE100-A, Thorlabs, Deutschland), ein elektrooptischer Modulator (EOM, L0202, Qioptiq, Deutschland) und eine Verzögerungsplatte ( $\lambda/4$ , AQWP05M-600, Thorlabs, Deutschland) werden verwendet um das linear polarisierte Licht in einer gewählten Frequenz um die eigene Achse zu drehen.

Ein elektrooptischer Modulator besteht aus einem nichtlinearen, doppelbrechenden Kristall, der unter Einwirkung eines elektrischen Feldes seinen Brechungsindex verändert. Damit wird eine Phasenverschiebung zwischen den beiden Polarisationskomponenten des Lichtes erzeugt und die zu einer veränderten Polarisation des Lasers nach dem EOM führt. Ein EOM kann also als eine Verzögerungsplatte betrachtet werden, die durch Anlegen einer Spannung veränderbar ist.

Im Mikroskop-Körper (IX70, Olympus, Deutschland) wird das Laserlicht durch einen dichroitischen Strahlenteiler (DS, zt532/640rpc, Chroma, USA) in das Ölimmersionsobjektiv (1U2B5362 UPL FL 100X/.6 - 1.30 Iris, Olympus, Deutschland) reflektiert, welches den Laser in die Probe fokussiert. Ein piezoelektrischer Tisch (P-517.3CL, E-501.00, Physik Instrumente GmbH&Co. KG, Deutschland) bewegt die Probe so über dem Objektiv, so dass diese in einem gewählten Bereich (meistens  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ ) gescannt werden kann. Das Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt, durch den dichroitischen Strahlenteiler vom Anregungslicht getrennt und durch einen Spiegel, der sich auf einer bewegbaren Schiene innerhalb des Mikroskop-Körpers befindet, bis zu einer Linse L2 reflektiert, die das Emissionslicht in eine Lochblende (50  $\mu\text{m}$ , Linos, Deutschland) fokussiert. Diese wird dazu verwendet jegliches Licht, das außerhalb des Fokus entstanden ist, zu blockieren, so dass nur das Fluoreszenzlicht des Farbstoffmoleküls im Fokus zu dem Detektor gelangt. Die Funktionsweise einer Lochblende ist in Abbildung 28A dargestellt. Mit der zweiten Linse L3 wird das Licht wieder parallelisiert, durch den Filter F (RazorEdge® 647, Semrock, USA) von unerwünschtem Laserlicht gereinigt und durch eine weitere Linse L4 auf die APD (Avalan-

che Photo Diode, SPCM, AQR 14, Perkin Elmer, USA)) fokussiert. Die Photonen werden durch ein zeitaufgelöstes Einzelphotonenzähl-Modul (Hydra Harp 400, PicoQuant, Deutschland) registriert, dem Laserpuls zugeordnet und anschließend mit in LabVIEW geschriebener Analysesoftware (FiFoScreenBurst.vi, AnnaLinescan2.0.vi) ausgewertet.

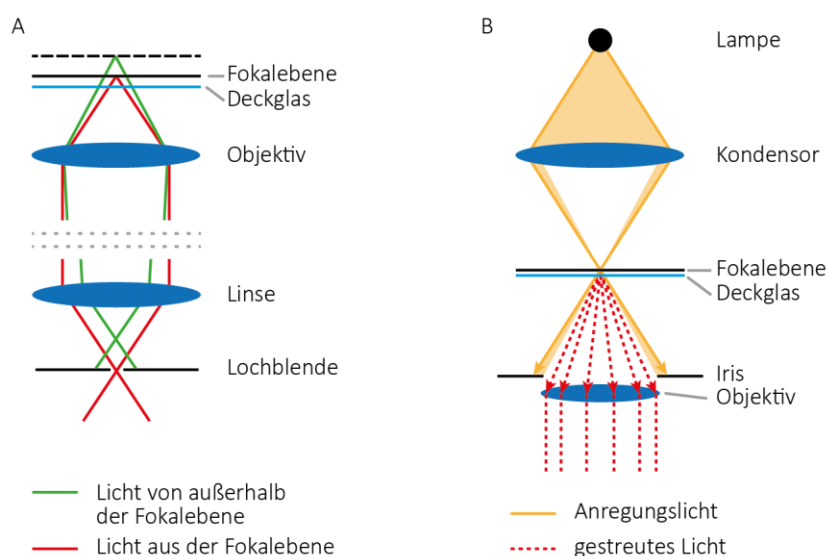


Abbildung 28: A) Funktionsweise eines konfokalen Mikroskops. B) Funktionsweise eines Dunkelfeldmikroskops.

Für die Dunkelfeld-Mikroskopie-Messungen wird eine Lampe (150 W Quartz-Halogen-Lampe, Fiber-Lite® DC950, Dolan-Jenner, USA) verwendet, die ihr Licht, wie in Abbildung 28B dargestellt, durch einen Kondensor (CytoViva, USA) in einem Winkel von 52° bis 63° auf die Probe fokussiert. Das Emissionsspektrum der Lampe ist in Abbildung A 10 abgebildet. Innerhalb des Objektivs befindet sich eine Iris, die die Numerische Apertur von 1,3 auf 0,6 verringern kann. Auf diese Weise wird das Licht der Lampe blockiert, während das Streulicht der Probe das Objektiv durchlaufen kann. Der piezoelektrische Tisch wird verwendet um die Probe zwischen Objektiv und Kondensor in der Tischebene zu bewegen.

Der dichroitische Spiegel wird entfernt, da er nur für die Fluoreszenzmessungen benötigt wird. Das gestreute Licht der Probe (z.B. der Gold-NP) gelangt zunächst zu einer Linse, die durch eine 1,6-fache Vergrößerung dafür sorgt, dass der Kamera-Chip optimal ausgeleuchtet wird. Anschließend filtert ein Linearpolarisator (LPVISB050MP2, Thorlabs) das Licht nach einer ausgewählten Polarisation. Der Polarisator kann manuell in 30°-Schritten gedreht werden. Das Streulicht gelangt weiter zu einem Spektrometer (ImSpector V10E Spektrograph, Specim, Spectral Imaging Ltd., Finnland), welches direkt an eine EMCCD-Kamera (iXon Ultra 897, Andor, Nordirland) angeschlossen ist. Das Spektrometer hat eine spektrale Auflösung von 2,8 nm und eine relative Polarisationsdifferenz laut Hersteller von etwa 1-2%. Es deckt einen Wellenlängenbereich von 380 bis 1000 nm ab.

Für die Spektren-Aufnahme und die Ansteuerung des piezoelektrischen Tisches wird ein in Micro Manager geschriebenes Programm (CytoViva) verwendet. Die erhaltenen Filme werden in ENVI4.8 (CytoViva) eingeladen und können dort bearbeitet werden. Zur automatisierten Auswertung wurden noch weitere Programme in LabVIEW geschrieben sowie auch für den direkten Vergleich der Dunkelfeldmessungen mit den Fluoreszenzmessungen am gleichen Molekül.

Wenn einzelne Parameter im Mikroskop-Aufbau verändert werden (z.B. Spiegel, Linse, Spektrometer-Position) muss auch immer das Spektrometer neu kalibriert werden. Dafür wird der Weißlichtlaser verwendet, mit dem unterschiedliche Wellenlängen (488 nm, 530 nm, 640 nm und 700 nm) durch Reflektion an einem Deckglas zum Spektrometer geleitet werden. In einem Histogramm wird mittels Gauß-Anpassung der Pixel ermittelt, der die jeweilige Wellenlänge detektiert (Abbildung 29A). Mittels einer linearen Regression der Laserwellenlänge gegen die Position auf dem Kamera-Chip wird eine Gleichung erhalten, mit der für jeden Pixel die entsprechende Wellenlänge berechnet werden kann (Abbildung 29B).

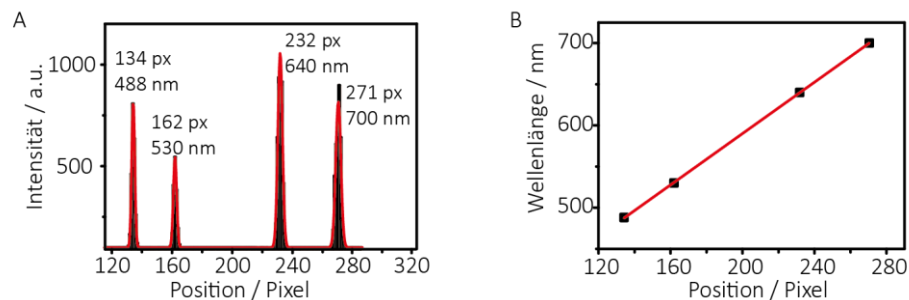


Abbildung 29: A) Histogramme der Pixelpositionen auf der Kamera zu den vier verwendeten Laserwellenlängen. B) Lineare Regression der Laserwellenlänge gegen die Position auf der Kamera.

Die für die Streulichtspektren verwendete Spektrometer-Kamera-Kombination kann des Weiteren auch für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren von Einzelmolekülen verwendet werden. Dafür wird der dichroitische Strahlenteiler wieder in den Strahlengang eingesetzt und das Farbstoffmolekül mit Laserlicht angeregt. Der Linearpolarisator vor dem Spektrometer wird entfernt und durch einen Filter (RazorEdge® 647, Semrock, USA) ersetzt.

### 3.1.2. Das Fluoreszenzmikroskop für FRET-Messungen

Ein zweiter konfokaler Mikroskop-Aufbau wurde verwendet um FRET-Messungen durchzuführen. Diese konnten nicht an dem oben beschriebenen Aufbau durchgeführt werden, da zum einen für Lösungsmessungen deutlich höhere Laserleistungen benötigt werden, die durch den Weißlichtlaser nicht abgedeckt werden können, und zum anderen bei FRET-Messungen zirkular polarisiertes Anregungslicht benötigt wird, damit die Farbstoffmoleküle, unabhängig von ihrer Ausrichtung, immer eine gleich starke Anregung erfahren. Dafür hätte der EOM entfernt werden müssen. In Abbildung 13 ist vereinfacht der Zwei-Farben-Mikroskop-Aufbau dargestellt. Dieser besteht aus zwei Lasern (640 nm, 80 MHz, LDH-D-C-640, Picoquant, Deutschland und 532 nm, Sapphire LP 532 nm 100 mW, Coherent, Deutschland), die durch einen AOTF (AOTFnc-VIS, AA optoelectronic, Frankreich) mit einer Frequenz von 10 kHz (100  $\mu$ s) alterniert werden. Eine optische Faser (FIBPM-VIS-2.0-SD5-FC8-FC8, LINOS, Deutschland) überführt den Laserstrahl von der Laser-Ebene auf die Mikroskop-Ebene und dient des Weiteren dazu das Strahlprofil zu reinigen. Mittels eines Linearpolarisators (LPVISE100-A, Thorlabs, Deutschland) und einer Verzögerungsplatte ( $\lambda/4$ , AQWP05M-600, Thorlabs, Deutschland) wird das linear-polarisierte Licht in zirkular-polarisiertes umgewandelt. Dieses wird benötigt um alle Farbstoffmoleküle in einer Probe unabhängig von ihrer Orientierung gleich gut anzuregen. Mittels eines Neutral-Dichte-Filters (OD 0-2, Thorlabs) wird die Intensität des Lasers reguliert. Das Licht wird innerhalb des Mikroskop-Körpers (IX-71, Olympus, Deutschland) durch einen dichroitischen Strahlenteiler (z532/633, AHF) in ein Öl-Immersionsobjektiv (UPLSAPO100XO, NA 1.40, Olympus, Deutschland) reflektiert, welches das Anregungslicht in die

Probe fokussiert. Um einen größeren Bereich der Probe untersuchen zu können wird die Probe mittels eines piezoelektrischen Tisches (P-517.3CL, Physik Instrumente GmbH&Co. KG, Deutschland) bewegt, sodass der Laser jeden Bereich der Probe beleuchtet.

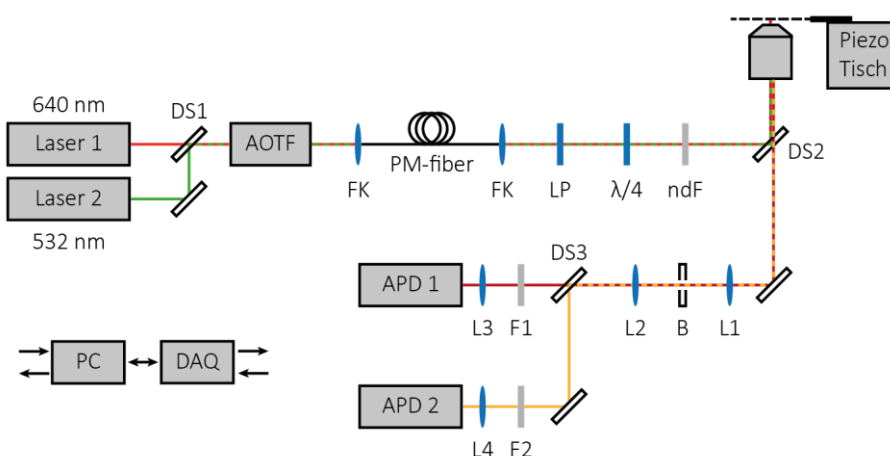


Abbildung 30: Vereinfachte Darstellung des Zwei-Farben-Mikroskop-Aufbaus für FRET-Messungen. PM: polarisationserhaltende Faser, ndF: Neutraldichtefilter, FK: Fasereinkoppler, LP: Linearpolarisator, DS: Dichroitischer Strahlenteiler, L: Linse, F: Filter, B: Lochblende, AOTF: akusto-optischer Filter.

Das Emissionslicht wird durch dasselbe Objektiv gesammelt, durch den dichroitischen Strahlenteiler vom Anregungslicht gefiltert und in eine Lochblende (50  $\mu\text{m}$ , Linos, Deutschland) fokussiert. Das Emissionslicht wird von einem dichroitischen Strahlenteiler (640DCXR, AHF) spektral aufgetrennt. Die Donorfluoreszenz ( $<640\text{ nm}$ ) wird durch zwei Filter (Brightline HC582/75, AHF, Deutschland und RazorEdge LP 532, Semrock, USA) von übrigem Anregungslicht gereinigt und durch eine Linse auf eine APD (t-SPAD-100, Picoquant, Deutschland) fokussiert. Die Akzeptor Emission ( $>640\text{ nm}$ ) wird gefiltert (Bandpass ET 700/75m, AHF, Deutschland und RazorEdge LP 647, Semrock, USA) und auf eine zweite APD (t-SPAD 100, Picoquant) fokussiert. Die Photonen werden durch eine Photonen-zählkarte (SPC-830, Becker&Hickl, Deutschland) registriert und können anschließend über hausgeschriebene LabVIEW-Programme (FiFoScreenburst.vi, DataReductionandAnalysis.vi) ausgewertet werden.

## 3.2. Auswertung

### 3.2.1. Zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung

Die zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung (TCSPC, *time correlated single photon counting*) wird verwendet, um die Fluoreszenzlebensdauer eines Farbstoffmoleküls zu bestimmen. Diese ist charakteristisch für einen Farbstoff und kann aufgrund ihrer Umgebungsabhängigkeit Informationen über Veränderungen der Umgebung liefern.

Für Fluoreszenzlebensdauer-Messungen (FLIM, engl. *fluorescence lifetime imaging microscopy*) wird ein gepulster Laser benötigt, der Lichtpulse in Nanosekunden-Intervallen aussendet (78 MHz/80 MHz) und so im Idealfall jedes Molekül einmal pro Zeitintervall anregt. Durch die Synchronisation des Laserpulses mit der Detektion (der APD) kann jedem auf der APD

registrierten Photon eine Zeit zugeordnet werden, die es von Aussenden des Laserstrahls benötigt bis es bei der APD registriert wird. Diese Information wird für Tausende von Laserpulsen gesammelt und in einem Histogramm dargestellt (s. Abbildung 31). Diese erhaltene Fluoreszenzabklingkurve stellt eine Faltung aus der sogenannten IRF (Antwort des Instruments, engl. *instrument response function*) und zeitlichen Verteilung der ausgesendeten Photonen des Farbstoffmoleküls dar. Die IRF selbst ist eine Faltung aus dem Laserpuls und allen Einflussfaktoren, die die Zeit bis zur Detektion verzögern.

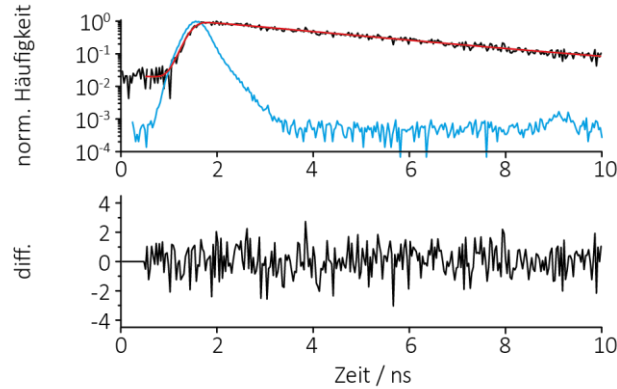


Abbildung 31: Fluoreszenzlebensdauer-Auswertung. Oben: Durch eine Entfaltung mit der IRF (blau) in FluoFit kann aus der gemessenen Fluoreszenzlebensdauerkurve (schwarz) die entfaltete Kurve (rot) erhalten werden. Aus dieser wird die Fluoreszenzlebensdauer (3,5 ns für Atto647N) extrahiert.

Um die reale Fluoreszenzlebensdauer zu erhalten muss die gemessene Fluoreszenzabklingkurve mit der IRF entfaltet werden. Da die IRF intensitätsabhängig ist müssen mehrere IRFs bei unterschiedlichen Intensitäten unter den Messbedingungen aufgenommen werden. Dafür wird die Reflektion des Lasers an einem Deckgläschen gemessen auf dem sich ein Tropfen Puffer befindet. Um bei hohen Intensitäten messen zu können, wird der Detektionsfilter vor der APD entfernt, nachdem sichergestellt wurde, dass dieser keinen Einfluss auf die IRF hat. Die kommerzielle Software FluoFit (Picoquant, Deutschland) wird verwendet um anschließend die Entfaltung durchzuführen. Diesem Vorgang liegt die folgende Formel (31) zugrunde.

$$I(t) = A_{\text{scat}} \cdot \text{IRF}(t) + \int_0^{\infty} \text{IRF}(t') \cdot A \cdot \exp\left(-\frac{t-t'}{\tau_{\text{Fl}}}\right) dt' \quad (31)$$

Der erste Term der Gleichung bezieht Streuung des Lasers an beispielsweise Gold-NP mit ein, die zur APD gelangt und die Fluoreszenzabklingkurve beeinflusst.  $A_{\text{scat}}$  ist dabei die Amplitude der Streuung, welche idealerweise vernachlässigbar ist für reine Farbstoff-Messungen. Der zweite Term beschreibt die Faltung aus IRF und Fluoreszenzabklingkurve, wobei  $A$  die Amplitude der Fluoreszenzabklingkurve und  $\tau_{\text{Fl}}$  die Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffmoleküls ist.

### 3.2.2. Alternierende Laseranregung ALEX / FRET Auswertung

Bei der alternierenden Laseranregung werden zwei Laser unterschiedlicher Wellenlängen (in dem hier vorliegenden Fall 532 nm und 640 nm) alterniert, sodass zwischen vier Detektionskanälen unterschieden werden kann: Donor-Emission bei Donor-Anregung  $I_{\text{D,D}}$ , Akzeptor-Emission bei Donor-Anregung  $I_{\text{D,A}}$ , Donor-Emission bei Akzeptor-Anregung  $I_{\text{A,D}}$  und Akzeptor-Emission bei Akzeptor-Anregung  $I_{\text{A,A}}$ .



Die Alternierungsrate der Laser wird so gewählt, dass zum einen das Molekül oft genug von beiden Lasern angeregt wird, bevor es das Detektionsvolumen verlässt oder Photobleichen eintritt. Zum anderen muss die Zeit pro Anregung lange genug sein um ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten.

Die FRET-Effizienz wird in dieser Arbeit aus den Intensitäten der unterschiedlichen Kanäle berechnet. Bei Donor-Anregung treten zwei Fälle auf: Zum einen emittiert der Donor selbst und zum anderen emittiert der Akzeptor durch den Energieübertrag vom Donor auf den Akzeptor. Da die FRET-Effizienz beschreibt, wie gut der Energieübertrag funktioniert, kann aus dem Verhältnis an im Akzeptor-Kanal detektierten Photonen zu allen detektierten Photonen bei Donor-Anregung die FRET-Effizienz berechnet werden.

$$E = \frac{I_{D,A}}{I_{D,A} + I_{D,D}} \quad (32)$$

Der Stöchiometrie-Faktor  $S$  gibt an in welchem Verhältnis die beiden Farbstoffmoleküle vorliegen. Für  $S = 1$  liegt nur Akzeptor vor, bei  $S = 0$  nur Donor und bei  $S = 0,5$  jeweils gleich viele Mengen Donor und Akzeptor.

$$S = \frac{I_{D,A} + I_{D,D}}{I_{D,A} + I_{D,D} + I_{A,A}} \quad (33)$$

### Lösungsmessungen

Die Auswertung von Lösungsmessungen wird im Folgenden erklärt und bezieht sich im Wesentlichen auf die Veröffentlichung von Lee et al. [68].

Zunächst ist zu beachten, dass bei Lösungsmessungen das Farbstoffmolekül durch den Fokus des Laserstrahls diffundiert. Dabei muss die Probe so stark verdünnt sein (pikomolar), dass sich idealerweise nie zwei oder mehr Moleküle gleichzeitig im Anregungsfokus befinden. Des Weiteren darf das Farbstoffmolekül während es sich durch den Fokus bewegt, nicht seine Intensität ändern (blinken, Photobleichen). Falls der Donor während der Zeit im Fokus ausgehen sollte, wird die FRET-Effizienz zu höheren Werten hin verschoben, da in diesem Fall eine gewisse Zeit nur Akzeptor-Emission detektiert wird. Falls der Akzeptor bleichen sollte, tritt der umgekehrte Fall ein und es wird mehr Donor-Emission detektiert, welches einen niedrigeren berechneten FRET-Wert zur Folge hat.

Um die aufgenommenen Daten auswerten zu können, muss zunächst eine Definition gefunden werden, die entscheidet, wann ein sogenannter „Burst“ (signifikante Erhöhung des Photonenstroms durch das Diffundieren eines Moleküls durch den Fokus) als Ereignis verarbeitet wird. Die Gruppe um C. A. M. Seidel hat dafür 2001 [69] den Grundstein gelegt und Eyal Nir hat 2006 eine Definition erstellt [70]. „*In this definition, photons belong to a burst if at least  $L$  successive photons have at least  $M$  neighboring photons within a time window of length  $T$  centered on their own arrival time.*“ Übersetzt bedeutet dies, dass Photonen zu einem Burst gehören, wenn innerhalb eines Zeitfensters  $T$  mindestens  $L$  aufeinanderfolgende Photonen mindestens  $M$  Nachbarphotonen haben. Typische verwendete Werte sind  $T = 500 \mu s$ ,  $L = 50$ ,  $M = 30$ .

Da bei Lösungsmessungen eine hohe Laserleistung ( $\sim 50\text{-}100 \mu W$ ) benötigt wird, ist auch in der Zeit, in der kein Molekül durch den Fokus diffundiert, ein erhöhter Photonenstrom zu messen. Dieser Hintergrund (engl. *Background*) wird nur mit

dem Puffer ohne Farbstoffmoleküle aufgenommen und für jeden Kanal ( $I_{D,D}$ ,  $I_{D,A}$ ,  $I_{A,D}$ ,  $I_{A,A}$ ) die mittlere Intensität bestimmt. Beispielhaft wird die Korrektur im Folgenden für den Fall der Donor-Anregung und Donor-Detektion dargestellt.  $I_{D,D}^{\text{bkgr}}$  ist die um den Hintergrund korrigierte Intensität, die bei Donor-Anregung auf dem Donor-Detektionskanal aufgezeichnet wird.  $Bkgr_{D,D}$  ist die gemessene Intensität bei Donor-Anregung und Detektion im Donor-Kanal, wenn kein Molekül sich im Fokus befindet.

$$I_{D,D}^{\text{bkgr}} = I_{D,D} - Bkgr_{D,D} \quad (34)$$

Da es bei den verwendeten hohen Laserleistungen dazu kommen kann, dass der Akzeptor durch den Donor-Anregungslaser zum Fluoreszieren angeregt wird, muss eine Korrektur für diese Ereignisse vorgenommen werden. Der Anteil der direkten Anregung (engl. *direct excitation*) wird aus der Akzeptor-Population berechnet, die etwa bei  $S = 0$  liegt. Der Anteil der im Akzeptor-Kanal detektierten Photonen bei Donor-Anregung, wird durch die Zahl der im Akzeptor-Kanal detektierten Photonen bei Akzeptor-Anregung geteilt.

$$dx = \frac{I_{D,A}^{\text{bkgr}}}{I_{A,A}^{\text{bkgr}}} \quad (35)$$

Des Weiteren kann es zu einem Übersprechen (engl. *leakage*) kommen, bei dem im Akzeptor-Detektionskanal fälschlicherweise Teile der Emission des Donors detektiert werden. Das Übersprechen wird aus der Donor-Population berechnet, die sich bei etwa  $S = 1$  befindet. Der Anteil der im Akzeptor-Kanal detektierten Photonen bei Donor-Anregung wird durch die Menge der im Donor-Kanal detektierten Photonen, die bei Donor-Anregung ausgelöst werden, geteilt.

$$lk = \frac{I_{D,A}^{\text{bkgr}}}{I_{D,D}^{\text{bkgr}}} \quad (36)$$

Da die direkte Anregung und das Übersprechen beide fälschlicherweise im Akzeptor-Kanal bei Donor-Anregung detektiert werden, wird dieser Wert korrigiert, um den realen Anteil der Akzeptor-Emission durch Energietransfer zu erhalten.

$$I_{\text{FRET}} = I_{D,A}^{\text{bkgr}} - lk \cdot I_{D,D}^{\text{bkgr}} - dx \cdot I_{A,A}^{\text{bkgr}} \quad (37)$$

Eine Korrektur um die Quantenausbeute ( $\phi_A$ ,  $\phi_D$ ) der Farbstoffmoleküle und die Detektionseffizienz der Detektoren ( $\eta_A$ ,  $\eta_D$ ) kann mit der Kalkulation des Gamma-Faktors erstellt werden.

$$\gamma = \frac{\phi_A \cdot \eta_A}{\phi_D \cdot \eta_D} \quad (38)$$

Beta hingegen korrigiert Unterschiede in der Anregungsintensität  $I_A^{\text{exc}}$ ,  $I_D^{\text{exc}}$  und den Absorptionsquerschnitten von Donor  $\sigma_D$  und Akzeptor  $\sigma_A$ .

$$\beta = \frac{I_A^{\text{exc}} \cdot \sigma_A}{I_D^{\text{exc}} \cdot \sigma_D} \quad (39)$$

Experimentell kann der Gamma-Faktor durch die globale Gamma-Korrektur ermittelt werden. Dabei wird der Kehrwert des um Hintergrund, direkte Anregung und Übersprechen korrigierte Stöchiometrie-Faktors  $S$  gegen die korrigierte FRET-Effizienz für zwei Populationen (unterschiedliche Proben, unterschiedliche Konformationen einer Probe) aufgetragen. Aus der Steigung  $b$  und dem y-Achsenabschnitt  $a$  können anschließend Gamma und Beta berechnet werden.

$$\gamma = \frac{a - 1}{a + b - 1} \quad (40)$$

$$\beta = a + b - 1 \quad (41)$$

Durch eine Korrektur der Donor- und Akzeptor-Emission nach Donor- bzw. Akzeptor-Anregung kann die gamma-korrigierte FRET-Effizienz und –Stöchiometrie erhalten werden:

$$E_{\gamma} = \frac{I_{\text{FRET}}}{I_{\text{FRET}} + \gamma \cdot I_{\text{D,D}}^{\text{bkgr}}} \quad (42)$$

$$S_{\gamma} = \frac{I_{\text{FRET}} + \gamma \cdot I_{\text{D,D}}^{\text{bkgr}}}{I_{\text{FRET}} + \gamma \cdot I_{\text{D,D}}^{\text{bkgr}} + \beta \cdot I_{\text{A,A}}^{\text{bkgr}}} \quad (43)$$

Wenn Moleküle untersucht werden, die sehr schnell ihre Konformation ändern, kann es vorkommen, dass dies innerhalb eines Bursts geschieht. In diesem Fall würde bei der oben angegebenen Kalkulation der FRET-Effizienz nur ein Mittelwert aus beiden Konformationen erhalten werden. Um aber eine Unterscheidung treffen zu können, wurde 2012 von Toma Tomov et al. [71] ein neuer Filter (FRET-2CDE, engl. *two-channel kernel-based density distribution estimator*) eingeführt.

$$\text{FRET} - 2\text{CDE} = 110 - 100 \cdot [E_{\text{D}} + (1 - E)_{\text{A}}] \quad (44)$$

$E_{\text{D}}$  ist die Summe aller FRET-Effizienzen um jedes Donor-Photon geteilt durch die Anzahl an Donor-Photonen  $N_{\text{D}}$ :

$$E_{\text{D}} = \frac{1}{N_{\text{D}}} \sum_{i=1}^{N_{\text{D}}} E_i \quad (45)$$

Die FRET-Effizienz für jedes Donor-Photon  $i$  ergibt sich aus der Dichte der Akzeptor-Photonen um ein Donor-Photon  $i$  ( $KDE_{\text{Di}}^{\text{A}}$ ) geteilt durch die Summe aus der Dichte der Akzeptor-Photonen um ein Donor-Photon  $i$  und der Dichte der Donor-Photonen um ein Donor-Photon  $i$  ( $KDE_{\text{Di}}^{\text{D}}$ ).

$$E_i = \frac{KDE_{\text{Di}}^{\text{A}}}{KDE_{\text{Di}}^{\text{A}} + KDE_{\text{Di}}^{\text{D}}} \quad (46)$$

Äquivalent zu  $E_{\text{D}}$  wird auch der  $1 - E$  um jedes Akzeptor-Photon berechnet.

$$(1 - E)_{\text{A}} = \frac{1}{N_{\text{A}}} \sum_{j=1}^{N_{\text{A}}} (1 - E)_j \quad (1 - E)_j = \frac{KDE_{\text{Aj}}^{\text{D}}}{KDE_{\text{Aj}}^{\text{D}} + KDE_{\text{Aj}}^{\text{A}}} \quad (47)$$

Wenn keine Dynamik vorliegt, also eine feste FRET-Effizienz erwartet wird, entspricht  $(1 - E)_{\text{A}}$  dem gemittelten  $1 - E$ . Dies führt dazu, dass der Wert in der Klammer von Gleichung (44) gegen 1 geht, was insgesamt zu einem FRET-2CDE-Wert

von 10 führt. Wenn Dynamiken auftreten, wird der Wert in der Klammer kleiner als 1 und der gesamte FRET-2CDE-Wert größer als 10. Indem ein Grenzwert des Filters festgelegt wird, kann zwischen unterschiedlichen Populationen unterschieden werden. In Abbildung 32 ist ein Beispiel für eine statische Verteilung (A) und eine dynamische Verteilung (B) dargestellt. Aus der Auftragung der FRET-2CDE-Werte gegen die FRET-Effizienz E ist zu erkennen, dass im Beispiel (B) unterhalb eines FRET-2CDE-Wertes von 11 eindeutig zwischen zwei Populationen unterschieden werden kann, wohingegen bei der statischen Probe (A) eine Einschränkung der Daten über den FRET-2CDE-Filter keine Verbesserung zur Folge hat.

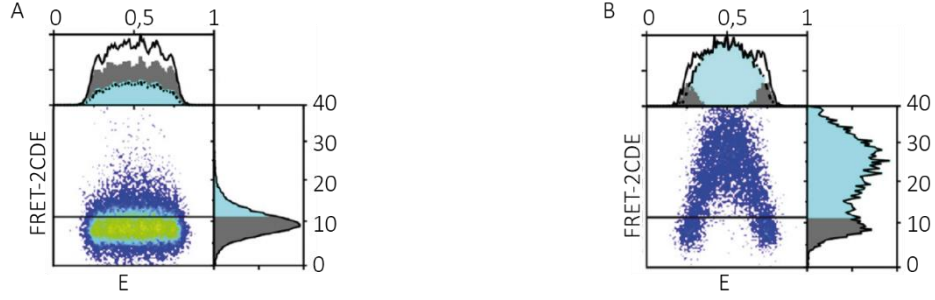


Abbildung 32: Beispiel für die Anwendung des FRET-2CDE-Filters. A) Unterschiedliche statische Populationen. B) Zwei dynamische Populationen. Schwarze Linie: Bursts, türkis: Bursts nach dem Filtern für FRET-2CDE < 11, grau: Bursts nach dem Filtern für FRET-2CDE > 11. Abbildung verändert und übernommen von [71].

Da kein Farbstoff perfekt ist, sollte beachtet werden, dass Helligkeitsfluktuationen (z.B. Blinken und Photobleichen) innerhalb von Bursts auftreten können. Um diese zu erkennen und zu korrigieren entwickelten Toma Tomov et al. zusätzlich zum FRET-2CDE-Filter noch einen ALEX-2CDE-Filter. Dieser wird verwendet um Bursts zu entfernen, die Intensitätsfluktuationen aufweisen.

$$ALEX - 2CDE = 100 - 50 \cdot [BR_{Dex} + BR_{Aex}] \quad (48)$$

$BR_{Dex}$  beschreibt das Verhältnis der Akzeptor-Helligkeit zur Donor-Helligkeit bei Donor-Anregung. Es ist gegeben als die Summe des Verhältnisses der Dichte aller bei Akzeptor-Anregung emittierten Photonen um ein bei Donor-Anregung erhaltenes Photon  $KDE_{Dexi}^{Aex}$  zu der Dichte aller bei Donor-Anregung emittierten Photonen um ein bei Donor-Anregung erhaltenes Photon  $KDE_{Dexi}^{Dex}$ .  $BR_{Aex}$  berechnet sich äquivalent.

$$BR_{Dex} = \frac{1}{N_{Aex}} \sum_{i=1}^{N_{Dex}} \frac{KDE_{Dexi}^{Aex}}{KDE_{Dexi}^{Dex}} \quad BR_{Aex} = \frac{1}{N_{Dex}} \sum_{j=1}^{N_{Aex}} \frac{KDE_{Aexj}^{Dex}}{KDE_{Aexj}^{Aex}} \quad (49)$$

Wenn keine Intensitätsfluktuationen auftreten, also das Helligkeitsverhältnis konstant ist, geht der Ausdruck in den Klammern (Formel (48)) gegen 2, da beide Helligkeitsverhältnisse bei 1 liegen. Dies führt dazu, dass die gesamte Gleichung gegen 0 geht. Bei Helligkeitsfluktuationen sind die Helligkeitsverhältnisse niedriger als 1 und so ergeben sich insgesamt ALEX-2CDE-Werte über 0.

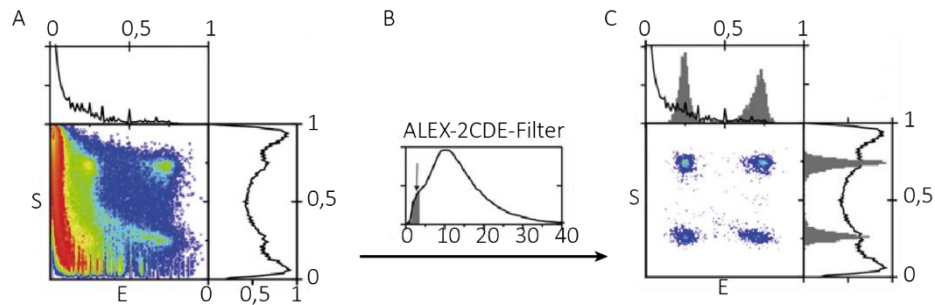


Abbildung 33: Beispiel für die Anwendung des ALEX-2CDE-Filters. A) E-S-Plot vor der Korrektur. B) ALEX-2CDE-Filter. C) E-S-Plot nach der Korrektur mit  $ALEX-2CDE < 4$ . Abbildung verändert und übernommen von [71].

In Abbildung 33 ist anhand eines Beispiels die Funktion des ALEX-2CDE-Filters dargestellt. Zunächst können aus den Daten kaum Informationen über die vier FRET-Populationen gezogen werden (A). Durch Festsetzen des ALEX-2CDE-Filters auf unter 4 (B) werden alle Bursts entfernt, die Intensitätsschwankungen enthalten (Blinken und Photobleichen) und es können die FRET-Populationen erhalten werden.

### Oberflächenmessungen / Hidden Markov Model

Lösungsmessungen haben den Vorteil, dass die Bestimmung von FRET-Effizienzen sehr schnell geht, da innerhalb weniger Minuten tausende von Molekülen durch den Anregungsfokus diffundieren. Obwohl dabei auch Dynamiken mithilfe der vorgestellten Filter kein Problem mehr darstellen bei der Aufklärung der Eigenschaften von Molekülen, fehlen immer noch die zeitlichen Informationen, wie beispielsweise Übergangsraten. Um diese zu erhalten, werden Oberflächenmessungen durchgeführt, bei denen für jedes Molekül die Intensität in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen wird.

Die aufgenommenen Intensitäts-Zeit-Spuren werden in FiFoScreenBurst.vi, durch Auftragen der Anzahl an detektierten Photonen pro Zeiteinheit, dargestellt und die Akzeptor-Emission und die Donor-Emission bei Donor-Anregung exportiert. Mit der Software HaMMMy, die von Taekjip Ha und Mitarbeitern geschrieben und 2006 im Biophysical Journal [72] vorgestellt wurde, kann eine Analyse mittels Hidden Markov Model (HMM) durchgeführt werden. Das HMM wird verwendet, um aus den gemessenen Daten die zugrundeliegenden, verborgenen (engl. *hidden*) Zustände zu erschließen. Dabei wird angenommen, dass die Übergangszeiten zwischen den Zuständen monoexponentiell verteilt sind. Dem Programm muss vorgegeben werden wie viele Zustände zu erwarten sind. Im Fall der im Beispiel (Abbildung 34) gezeigten Holliday Junction werden zwei Zustände (hoher und niedriger FRET) erwartet.

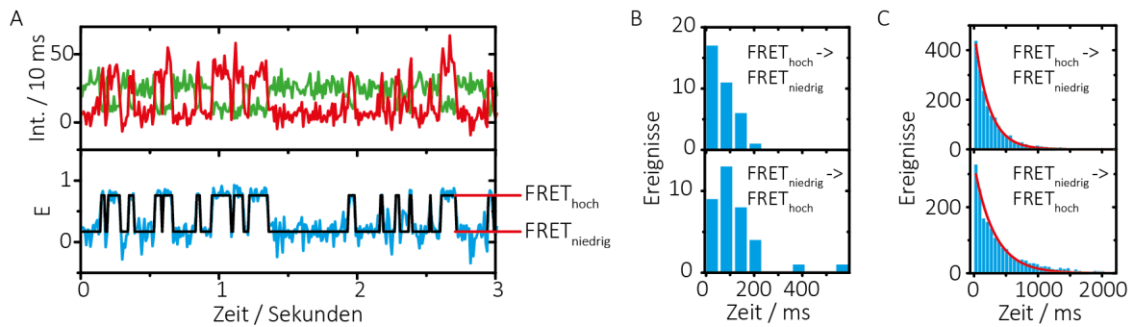


Abbildung 34: A) Anwendung des Hidden Markov Models auf die Intensitäts-Zeit-Spuren von einer Holliday Junction mit Cy3/Cy5. Oben: Intensität des Donors (grün,  $I_D^D$ ) und des Akzeptors (rot,  $I_D^A$ ) bei Donor-Anregung. Unten: FRET-Effizienz pro Zeiteinheit (blau) und Annäherung mit Hidden Markov Model (schwarz). B) Histogramme über die Verweildauern des Moleküls aus A). C) Histogramme über die Verweildauer aller Moleküle der Messung für den Übergang von hoher FRET-Effizienz zu niedriger und umgekehrt, angepasst mit einem monoexponentiellen Fit (rot).

Das Programm berechnet aus den gegebenen Intensitäten die FRET-Effizienz pro Zeiteinheit über  $E = I_{D,A}/I_{D,A} + I_{D,D}$ . Anschließend werden die Daten mit dem HMM ausgewertet (s. Abbildung 34 unten) um durch einen iterativen Prozess die Übergangswahrscheinlichkeiten und die FRET-Effizienzen der Zustände zu ermitteln. Bei dem HMM werden so lange die Parameter (Übergangswahrscheinlichkeit, FRET-Effizienzen, Breite der Verteilung) variiert bis die maximale Wahrscheinlichkeit erreicht wird (Maximum-Likelihood-Methode). Dieser Vorgang wird für jedes untersuchte Molekül wiederholt. Das Programm liefert aus dem HMM für jedes Molekül die Verweilzeit in einem Zustand bevor es einen Übergang in einen anderen Zustand macht. Anschließend können die Verweilzeiten aller Moleküle auf die möglichen Übergänge aufgeteilt und in einem Histogramm dargestellt werden. In Abbildung 34B ist dies beispielhaft für die Spur aus A, also für ein einzelnes Molekül dargestellt. Je mehr Moleküle untersucht werden, umso besser wird das Histogramm und der mono-exponentielle Fit (Abbildung 34C).

### 3.2.3. Dunkelfeldmikroskopie Auswertung

#### Aufnahme der Spektren

Das Spektrometer kann immer nur eine detektierte Zeile der Probe (1x512 Pixel) spektral aufspalten (s. Abbildung 35A), sodass pro Aufnahme auf dem Kamera-Chip in horizontaler Ebene die Position der Probe abgebildet wird, während senkrecht dazu die Photonen sortiert nach ihrer Energie (Wellenlänge) detektiert werden (s. Abbildung 35B). Um einen gesamten Bereich einer Probe abbilden zu können, bewegt der piezoelektrische Tisch die Probe entlang einer Achse (Scanrichtung) und es wird mit jeder Bewegung ein Bild aufgenommen (s. Abbildung 35C). Auf diese Weise wird ein Datenwürfel erhalten, der in der Software ENVI4.0 zu einem Bild zusammengesetzt wird (s. Abbildung 35D), bei dem durch Auswählen von Positionen die entsprechenden Spektren erhalten werden können (s. Abbildung 35E). Jeder einzelne Pixel enthält Informationen über die Position des Moleküls in der Probe und dessen Spektrum (s. Abbildung 35D und E).

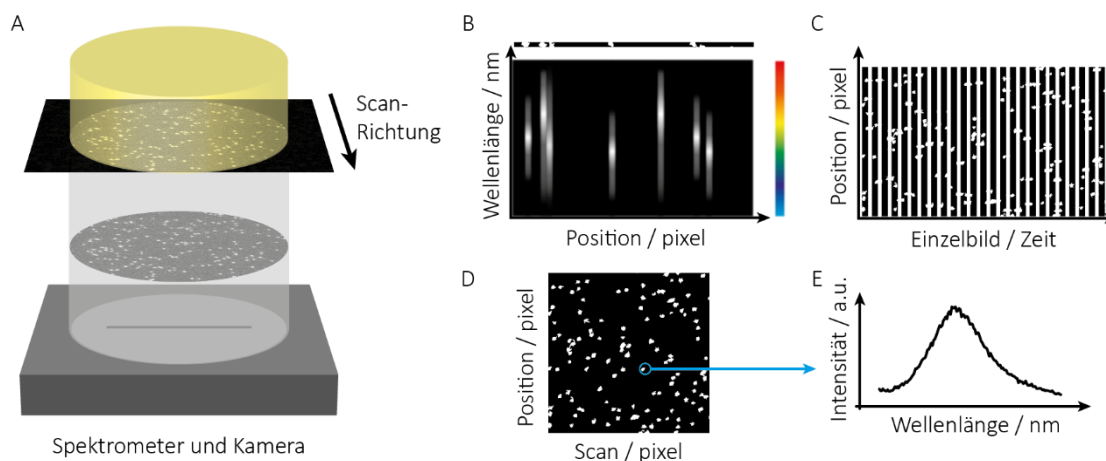


Abbildung 35: A) Prinzip der Dunkelfeld-Mikroskopie-Aufnahme mit dem Spektrometer und der Kamera. B) Spektrale Auftrennung eines Einzelbildes. C) Darstellung der zeitlichen Detektion der Einzelbilder. D) Nach Zusammenfügen aller Einzelbilder erhaltenes Gesamtbild. E) Gemitteltes Spektrum über mehrere Pixel aus D).

### Korrektur der Spektren um Hintergrund und um das Lampenspektrum

Da durch die Lampe Streuung am Glas entsteht, müssen die erhaltenen Spektren um den Hintergrund korrigiert werden. Dieser wird aus der Messung der Probe ermittelt. Dafür wird in einem Bereich in dem sich keine Moleküle befinden, ein Mittelwert aus den Intensitäten der einzelnen Pixel gebildet. Der so ermittelte Hintergrund wird anschließend von jedem Pixel des gemessenen Bildes subtrahiert.

Die Streuung am Glas ist jedoch nicht der einzige Einflussfaktor, der korrigiert werden muss. Die Spektren werden dadurch erhalten, dass die Lampe die metallischen Nanopartikel (mNP) beleuchtet und diese aufgrund ihrer Oberflächenplasmonen bestimmte Wellenlängen des Lichts streuen. Das gestreute Licht wird anschließend auf der Kamera detektiert. Während die erhaltenen Wellenlängen durch die Oberflächenzusammensetzung der Partikel vorgegeben werden, ist die Intensität nicht nur Proben-spezifisch, sondern auch von der Lampe abhängig. Je heller die Lampe ist, desto mehr Photonen kann das Partikel streuen. Da die Lampe jedoch keine konstante Intensität über das ausgesendete Spektrum besitzt, werden abhängig von der Wellenlänge mehr oder weniger Photonen durch die mNP gestreut. Aus diesem Grund muss eine Korrektur um das Lampenspektrum für die aufgenommenen Bilder durchgeführt werden. Dafür wird das Lampenspektrum in einer separaten Messung aufgenommen. Die Flusskammer (s. Kapitel 3.3.3) mit der Probe wird durch eine Flusskammer, die nur den Messpuffer enthält, ausgetauscht und bei der Messung die Iris des Objektivs geöffnet. So wird das gesamte Licht der Lampe detektiert mitsamt aller Variablen, die das Spektrum der Lampe potentiell verändern können (Optiken, Objektträger, Deckglas). Das gemessene Bild wird in ENVI4.0 eingeladen und dargestellt. Alle Pixel werden ausgewählt und ein gemitteltes Spektrum über alle Pixel erstellt. Der Hintergrund wird wie zuvor beschrieben korrigiert und anschließend das Spektrum durch Dividieren mit dem höchsten Wert normiert.

Das gemessene Bild der Probe wird eingeladen und alle Pixel ausgewählt. Durch dividieren der Spektren durch das normierte Lampenspektrum wird für jeden Pixel ein korrigiertes Spektrum erhalten.

### Auswertung der Dunkelfelddaten

Das erhaltene Bild wird als PNG- und als ASCII-Datei inklusive der Spektren-Informationen exportiert um es anschließend mit selbstgeschriebener LabVIEW-Software analysieren zu können. Die ASCII-Datei besteht aus in Blöcken aufgeteilten Spalten und Zeilen. Jede Spalte gibt die x-Position und jede Zeile die y-Position des Moleküls an. Die Nummer des Blocks ergibt die Wellenlänge und der Wert in einer Spalte/Zeile die Intensität des an dieser Position befindlichen Moleküls bei der entsprechenden Wellenlänge. Diese Datei sowie das Bild (.png) können in ein LabVIEW-Programm (DF\_Wavelength\_Analysis.vi) eingeladen werden. Die Moleküle können automatisch mit einem Spot-Finder in dem Bild gesucht werden. Dabei wird ein Intensitätsschwellenwert vorgegeben und der Bereich des Bildes ausgewählt, der analysiert werden soll. Zudem kann auch die Größe der Spots vorgegeben werden, um Cluster von Molekülen aus der Auswertung zu entfernen (Abbildung A 1). Die Spots werden anschließend von der Software aus der ASCII-Datei gesucht und deren Spektren graphisch dargestellt. Dafür muss die Startwellenlänge vorgegeben werden und es kann ausgewählt werden, über wie viele Pixel das Signal gemittelt werden soll, um das Rauschen auf den Graphen zu reduzieren (siehe Abbildung A 2). Anschließend können alle Graphen mit einem asymptotischen Fit (50) angenähert werden, um das Intensitätsmaximum und die zugehörige Wellenlänge zu ermitteln. Die Graphen und die Fit-Ergebnisse werden für weitere Auswertungsschritte in Origin importiert.  $y_0$  stellt den Offset des Graphen dar, während  $x_c$  das Zentrum der Kurve ist und  $A$  die Amplitude.  $w_1$  ist die Breite auf halber Höhe (FWHM, engl. *Full Width at Half Maximum*).  $w_2$  und  $w_3$  sind Formparameter, wobei  $w_2$  die Varianz in Richtung kleinerer x-Werte ist und  $w_3$  in Richtung größerer x-Werte.  $y$  ist die Intensität und  $x$  die Wellenlänge.

$$y = y_0 + A \cdot \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{x - x_c + \frac{w_1}{2}}{w_2}\right)} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{x - x_c - \frac{w_1}{2}}{w_3}\right)}\right) \quad (50)$$

Falls mehrere Aufnahmen der gleichen Oberfläche durchgeführt werden, können die Koordinaten aller Spots exportiert werden. In einem weiteren LabVIEW-Programm (DF\_Wavelength\_Analysis\_overlay.vi) werden die Bilder übereinandergelegt und mittels der eingeladenen Koordinaten das neue Bild ausgewertet. So ist ein direkter Vergleich der Spektren gleicher Moleküle von unterschiedlichen Aufnahmen möglich.

### 3.2.4. Auswertung der kombinierten Dunkelfeld- und Fluoreszenzmessung

#### Kombination der Dunkelfeld-Daten und der Fluoreszenzdaten

Um die Dunkelfeld-Daten mit den Fluoreszenzdaten vergleichen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere LabVIEW-Software geschrieben (DF\_CF\_Analysis.vi). In dieser werden zunächst die Dunkelfeld- und die konfokalen Bilder eingeladen (Abbildung A 5) und manuell übereinandergelegt (Abbildung A 6). Bei der Aufnahme der konfokalen Spuren wird die Nummer jeder Spur in einer weiteren Datei gespeichert. Diese muss eingeladen werden, um anschließend die Spuren dem übereinandergelegten Bild von Dunkelfeld- und konfokaler Messung zuordnen zu können (Abbildung A 7). Anschließend werden wieder über einen Spot-Finder die Spots in dem Dunkelfeld-Bild gesucht und daraufhin die Auswertung der Spektren mit dem asymptotischen Fit durchgeführt. Zusätzlich zu den Spektren und den ermittelten Fit-Parame-



tern wird noch das übereinandergelegte Bild aus Dunkelfeld- und konfokaler Messung mit den zugehörigen Nummern exportiert um im Anschluss in Origin die Ergebnisse der Dunkelfeld-Auswertung denen aus der konfokalen Auswertung zuordnen zu können (Abbildung 36).

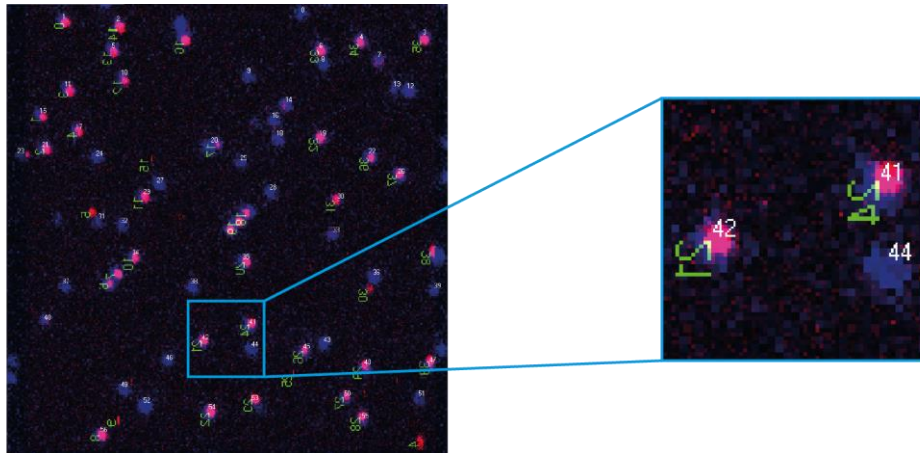


Abbildung 36: Auswertung der kombinierten Dunkelfeld- und konfokalen Messung in DF\_CF\_Analysis.vi. Übereinandergelegtes Bild aus der Dunkelfeld- und der konfokalen Messung. 20x20µm.

Bei den konfokalen Messungen ergeben sich aufgrund der Kopplung des Farbstoffmoleküls mit den mNP bei Verwendung des EOM oszillierende Intensitäts-Zeit-Spuren (Abbildung 37). Die Fluoreszenzlebensdauer wird über die gesamte Spur ermittelt und in FluoFit korrigiert.

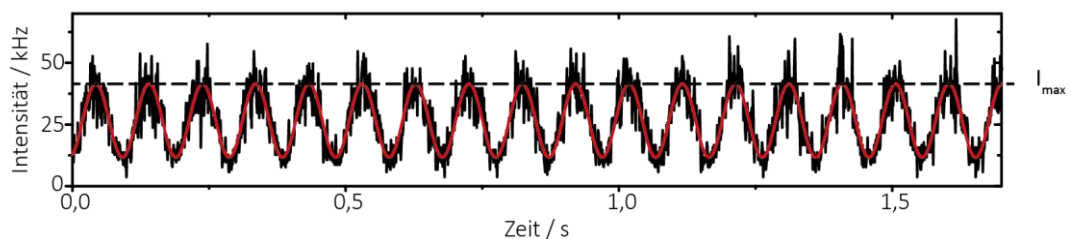


Abbildung 37: Intensitäts-Zeit-Spur von Atto647N an einer säulenförmigen DNA-Struktur mit 60 nm Gold-NP (schwarz). Die Frequenz des EOM liegt bei 10 Hz. In rot ist der angepasste Sinus-Fit zu sehen.

Für die Berechnung der maximalen Intensität wird der Bereich der Spur, in dem kein Blinken oder Photobleichen auftritt, ausgewählt (Abbildung A9) und nach einer Hintergrundkorrektur an die Spur eine Sinusfunktion (51) angepasst. Dabei müssen Startwerte für die Parameter, die angenähert werden soll, vorgegeben werden. Die Verschiebung entlang der y-Achse  $y_0$  wird grob abgeschätzt, ebenso wie die Amplitude A. Die Periode w ist der Einstellung des EOMs für die Messung zu entnehmen (z.B. 10 Hz). Die Phasenverschiebung kann zunächst Null gesetzt werden. Aus Summe aus der Verschiebung entlang der y-Achse  $y_0$  und der Amplitude A wird die maximale Intensität  $I_{\max}$  bestimmt.

$$y = y_0 + A \cdot \sin\left(\pi \cdot \left(\frac{x - x_1}{w}\right)\right) \quad (51)$$

### Korrektur der Spektren aufgrund der Polarisationsabhängigkeit

Da das Spektrometer eine Polarisationsabhängigkeit aufweist, müssen die erhaltenen Spektren bei Messungen mit dem Linearpolarisator um diese korrigiert werden.

Bei den kombinierten Messungen aus Dunkelfeld- und Fluoreszenzmikroskopie werden die Spektren aller Partikel, die ein Farbstoff-Gegenstück aufweisen, ausgewertet. Bei den Messungen, die nur im Dunkelfeld stattfinden, werden zunächst alle Partikel in die Auswertung aufgenommen. Weiterhin werden nur die Partikel für die Bestimmung des Korrekturfaktors verwendet, die keine signifikante Verschiebung ihres Spektrums zu höheren oder niedrigeren Wellenlängen zeigen. Dem liegt zugrunde, dass im Idealfall ein einzelnes Partikel, unabhängig von der Polarisation des Anregungslichts, immer das gleiche Streuspektrum zeigt. Die erhaltenen Wellenlängen bei maximaler Streuung für 30°, 60° und 90° (Linearpolarisator) werden gegen 0° aufgetragen. In Abbildung 38 ist die Berechnung der Korrektur für 60 nm Gold-NP an der DNA-Origami Nanoantenne dargestellt.

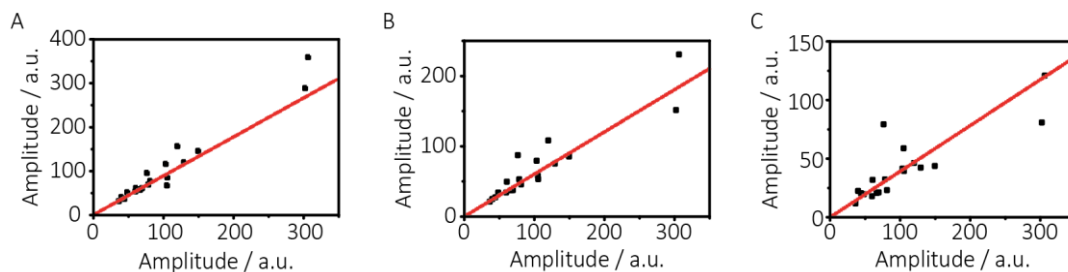


Abbildung 38 Amplitudenkorrektur für 60 nm Gold-NP an der DNA-Origami Nanoantenne. A) 30° gegen 0°, Korrekturfaktor: 0,887, B) 60° gegen 0°, Korrekturfaktor: 0,601 C) 90° gegen 0°, Korrekturfaktor: 0,392.

Mit den aufgetragenen Punkten wird eine lineare Regression durchgeführt, bei der der y-Achsenabschnitt auf null festgelegt wird. Die Steigung der Geraden wird im Weiteren als Korrekturfaktor verwendet. Die Spektren aller Moleküle werden durch den Korrekturfaktor dividiert, um die korrigierten Spektren zu erhalten.

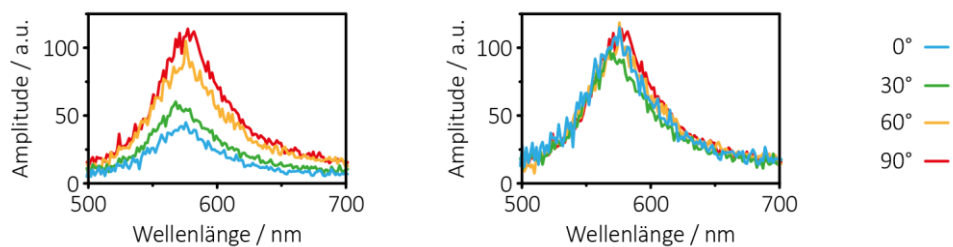


Abbildung 39: Korrektur des Spektrums eines 60 nm Gold-NP an einer säulenförmigen DNA-Origami Nanoantenne. A) Spektrum vor der Korrektur bei unterschiedlichen Polarisierungen. B) Spektrum nach der Korrektur bei unterschiedlichen Polarisierungen.

Eine andere Möglichkeit der Korrektur ist es, das Lampenspektrum selbst bei unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators aufzunehmen und ebenfalls die registrierte Helligkeit für 30°, 60° und 90° gegen 0° aufzutragen. Dies wurde in der Praxis durchgeführt und lieferte ähnliche Ergebnisse wie die zuvor vorgestellte Methode. Der Vorteil der Korrektur über

die aufgenommenen Streulichtspektren gegenüber der Korrektur mit dem Lampenspektrum ist, dass zusätzlich Intensitätsschwankungen durch leichte Verschiebung des Kondensors bzw. des Objektivs einbezogen werden sowie auch mögliche minimale Schwankungen der Lichtintensität der verwendeten Lampe.

### 3.3. Probenvorbereitung

#### 3.3.1. Herstellung der DNA-Origami-Strukturen

Die DNA-Origamis werden aus einem zirkulären Einzelstrang, dem Gerüststrang, und vielen kurzen Einzelsträngen, den Heftsträngen, gefaltet. Die verwendeten Stränge inklusive der genauen Rezepte für jedes DNA-Origami sind in den entsprechenden Veröffentlichungen [11, 17, 26] aufgeführt. Das rechteckige DNA-Origami wurde analog zu dem von C. Steinhauer et al. [73] verwendeten DNA-Origami hergestellt und für den Anwendungszweck modifiziert (Heftstränge siehe Anhang 6.5).

Der Gerüststrang wird mit einer Konzentration von 10 bis 20 nM bei der Faltung eingesetzt, während die unmodifizierten Heftstränge in einem hohen Überschuss (60 nM bis 90 nM) der Synthese zugesetzt werden. Einige ausgewählte Heftstränge werden durch modifizierte (z.B. mit Biotin oder Farbstoffmolekül markierte) Heftstränge, je nach experimenteller Anforderung, ausgetauscht.

Durch ein Aufheizen der Probe wird zunächst sichergestellt, dass alle Stränge unhybridisiert vorliegen und sich keine Sekundärstrukturen ausbilden. Anschließend wird die Probe über einen längeren Zeitraum abgekühlt, wodurch gewährleistet wird, dass sich alle Heftstränge an den Gerüststrang anlagern können. Das Temperaturprogramm ist je nach DNA-Origami unterschiedlich lang und aufwendig. Während für ein einfaches zweidimensionales DNA-Origami eine Faltungsdauer von einer bis zwei Stunden verwendet wird, benötigt ein dreidimensionales DNA-Origami bis zu 24 Stunden. Die Temperaturprogramme sind wie auch die Rezepte den entsprechenden Veröffentlichungen [11, 17, 26] zu entnehmen.

Die Aufreinigung der DNA-Origami kann auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen, die wiederum abhängig von dem jeweiligen DNA-Origami sind.

Bei der Aufreinigung durch Filtrierung wird ein Amicon Filter (Amicon Ultra – 0,5 ml, Ultracel® - 100K Membrane, Millipore) verwendet. In diesen werden 100 µl der Probe mit 400 µl 1xTAE-Puffer (+ 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>) gegeben und das Ganze acht Minuten lang bei 4°C und 14 kr<sub>cf</sub> gefiltert. Der Puffer, der die ungebundenen Stränge enthält, wird anschließend entfernt und der Filter erneut mit 1xTAE (+ 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>) befüllt. Die letzten zwei Schritte werden zweimal wiederholt, bis der Puffer keine überschüssigen DNA-Stränge mehr enthält. Anschließend wird der Filter umgedreht, in ein neues Mikrolitergefäß gestellt und die Probe durch Rotation bei 1 kr<sub>cf</sub> und 4°C für drei Minuten zurückerhalten.

Die zweite Methode ist die Gelelektrophorese. Dafür wird ein Gel aus einer 1,5%igen Agarose-Lösung (Biozym LE Agarose) in 0,5xTAE-Puffer hergestellt. Die Lösung wird in einer Mikrowelle aufgeköcht, um die Agarose vollständig zu lösen. Nach einer kurzen Abkühlzeit auf 40° bis 50°C wird das Gel mit Magnesiumchlorid versetzt, sodass sich eine Endkonzentration von 11 mM einstellt. Damit die DNA-Origami im Gel sichtbar gemacht werden, wird dem Gel zusätzlich Sybr®Safe (Invitro-

gen) im Verhältnis 1:10 zugesetzt. Die Lösung wird anschließend in einen Geleinsatz (BioRad) gefüllt und ein Gelkamm (BioRad) eingesetzt. Dieser kann nachdem das Gel getrocknet ist entfernt werden und es bleiben kleine rechteckige Hohlräume, die sogenannten Geltaschen, zurück. Das Volumen der Geltaschen beträgt bei den großen Gelkammern etwa 30  $\mu\text{l}$ . Das Gel wird anschließend in die Gelkammer (Mini-Sub® Cell GT Cell, BioRad) eingesetzt und mit 0,5xTAE (+ 11 mM  $\text{MgCl}_2$ ) umspült. Die DNA-Origami Probe wird mit einem Ladepuffer im Verhältnis 1:6 (v/v) versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Der Ladepuffer besteht aus 30% Glycerin, welches die Probe beschwert, sodass sie im Gel bleibt, und 0,025% Bromphenolblau. Dieser Farbstoff wandert aufgrund seiner Ladung und Größe schneller durch das Gel und zeigt durch seine Blaufärbung den Fortschritt der Elektrophorese an. An das Gel wird eine Spannung von 1 V/cm angelegt und die Elektrophorese für etwa 2 Stunden durchgeführt. Da es bei der angelegten Spannung zu einem Stromfluss von bis zu 100 mA kommen kann, muss ein Schmelzen des Gels vermieden werden. Daher wird die Gelkammer mit Eiswasser gekühlt. Nach Ablauf der Elektrophorese wird das Gel der Kammer entnommen und auf einen UV-Tisch gelegt. Die UV-Strahlung sorgt dafür, dass die mit Sybr®Safe angefärbte DNA sichtbar wird. In Abbildung 40 ist ein solches Gel von einem zweidimensionalen rechteckigen DNA-Origami (NRO, engl. *New rectangular origami*) dargestellt. Die Fließrichtung ist von oben (Minuspol) nach unten (Pluspol). Die einzelsträngige DNA fließt am schnellsten durch das Gel, da sie eine geringere sterische Hinderung verspürt und ein größeres Ladung-zu-Fläche-Verhältnis hat. Nachfolgend befindet sich eine Bande mit den DNA-Origami Monomeren, welche mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden und als letztes sind Aggregate bzw. DNA-Origami-Dimere, die aufgrund ihrer Masse langsamer durch das Gel wandern.

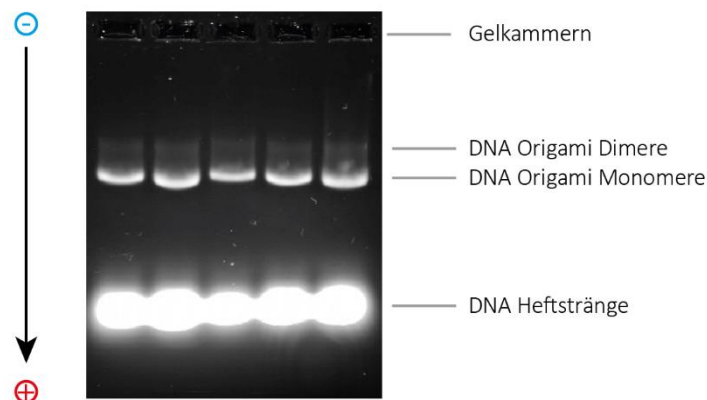


Abbildung 40: Gel-Elektrophorese von rechteckigen DNA-Origami nach der Faltung.

Die ausgeschnittenen Gelstücke werden zwischen zwei Objektträgern, welche mit Parafilm M® (Bemis) umwickelt sind, eingeklemmt und ausgedrückt. Die erhaltene Flüssigkeit wird mit einer Pipette in ein Mikrolitergefäß überführt und entweder sofort verwendet oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

### 3.3.2. Funktionalisierung von metallischen Nanopartikeln

Die Funktionalisierung der mNP wurde innerhalb der Arbeitsgruppe über viele Jahre weiterentwickelt. Das aktuelle Protokoll, das sich an dem Protokoll von Mirkin et al. [75] orientiert, ist der Publikation von Vietz et al. [74] zu entnehmen.

Damit die Gold- und Silber-NP an DNA-Origami anbinden können, müssen sie zunächst mit einzelsträngiger DNA beladen werden. Zu diesem Zweck wird mit Thiol (-SH) modifizierte DNA verwendet, da diese mit dem Metall eine stabile Schwefel-Metall-Verbindung ausbildet. Die negative Ladung der DNA sorgt jedoch für eine Abstoßung zwischen der DNA und dem

Metall. Um dies zu umgehen, muss der Lösung schrittweise Natriumchlorid zugesetzt werden. Würde das Natriumchlorid direkt zugesetzt werden, würden die mNP aggregieren. Um eine möglichst hohe Dichte an DNA pro mNP zu realisieren, wird bei der Funktionalisierung eine Temperatur von 40°C verwendet.

Im ersten Schritt wird ein Schnappdeckelglas und ein Rührfisch mit MilliQ-Wasser gereinigt und getrocknet. Im Anschluss werden 2 ml der mNP-Lösung (OD 1, BBI Solutions) zusammen mit dem Rührfisch in das Schnapp-Deckelglas überführt und auf 40°C geheizt. Während des gesamten Vorgangs wird die Temperatur konstant gehalten und die Lösung mit dem Rührfisch durchmischt. Der Lösung werden 20 µl Tween20 (10%), 20 µl P8709/P8584 (4:5) und eine angemessene Menge der entschützten thiolierten DNA-Stränge zugefügt. Die Menge der DNA richtet sich nach der Größe der Partikel. Das zu verwendende Volumen an DNA ist Tabelle 1 zu entnehmen.

*Tabelle 1: Zu verwendendes Volumen an DNA-Strängen [100 µM] für die mNP-Funktionalisierung.*

Nanopartikelgröße [nm]	20	40	60	80	100
Volumen [µl]	24	12	7,75	5,75	9,2

Nach einer Stunde Durchmischung wird das schrittweise Aussalzen mit Natriumchlorid begonnen. Dabei werden alle drei Minuten dem Reaktionsgemisch entsprechend Tabelle 2 Natriumchlorid-Lösung (3,3 M NaCl, 1xPBS) zugesetzt bis eine Endkonzentration von 750 mM NaCl erhalten wird.

*Tabelle 2: Aussalzungstabelle.*

Schritt	Menge [µl]
1 – 2	10
3 – 6	20
7 – 10	50
11 – 13	100

Um die Partikellösung von überschüssiger DNA zu trennen werden die Partikel durch Zentrifugieren vom Puffer getrennt. Das erhaltene Pellet wird 1:1 mit PBS10 (siehe Anhang 6.4) verdünnt und bei 2,8 kr<sub>cf</sub> und 20°C acht Minuten lang zentrifugiert. Für kleinere Partikel muss die Zeit entsprechend erhöht werden. Der Überstand wird verworfen und durch 1 ml PBS10 Puffer ersetzt. Dieser Vorgang wird sooft wiederholt, bis im Absorptionsspektrometer (NanoDrop2000, Thermo Scientific) keine Absorption durch DNA im Überstand mehr zu detektieren ist.

### 3.3.3. Oberflächenvorbereitung

Für alle Einzelmolekülfluoreszenzmessungen wurden Nunc™ LabTek™ Kammern (Thermo Fischer, USA) verwendet (Abbildung 41A). Diese bestehen aus einem dünnen Glas, das mit acht Glaskammern beklebt ist. In jede dieser Kammern können bis zu einen Milliliter Probe gefüllt werden. Da die Nunc™ LabTek™ Kammern nicht speziell für Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie hergestellt werden, müssen diese zuvor mit KOH (1M, Roth) gereinigt werden.

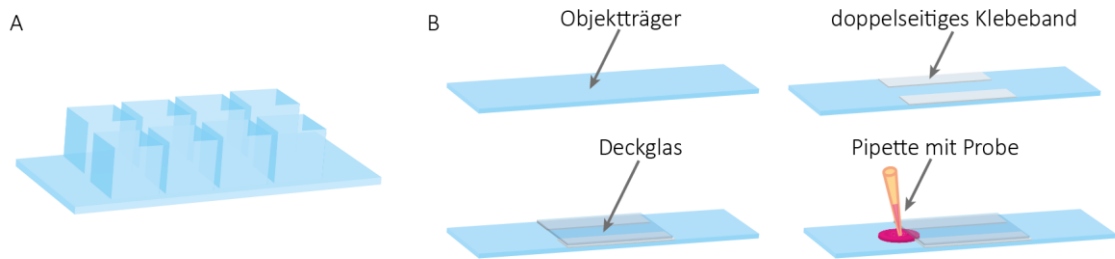


Abbildung 41: A) LabTek™-Kammer. B) Präparation einer Flusskammer.

Für die Dunkelfeldmessungen wurden selbstgebaute Flusskammern verwendet. Diese bestehen aus einem einen Millimeter dicken Objektträger (kalk-Natron-Glas, Roth) und einem 0.17 mm dünnen Deckglas (Borosilikatglas, Roth). Diese werden zunächst mit 70% Ethanol und Methanol gereinigt und anschließend mit doppelseitigem Klebeband (Scotch) zusammengeklebt, sodass ein Hohlraum entsteht. Die Probe wird auf einer Seite der Flusskammer auf den Objektträger pipettiert und durch den Kapillareffekt in die Kammer gezogen (Abbildung 41B). Für die Messungen mit mNP muss die Probe auf das Deckglas gegeben werden bevor dieses mit dem Objektträger zusammengeklebt wird. Auf diese Weise werden störende Effekte durch Streuung der mNP, die am Objektträger haften würden, vermieden.

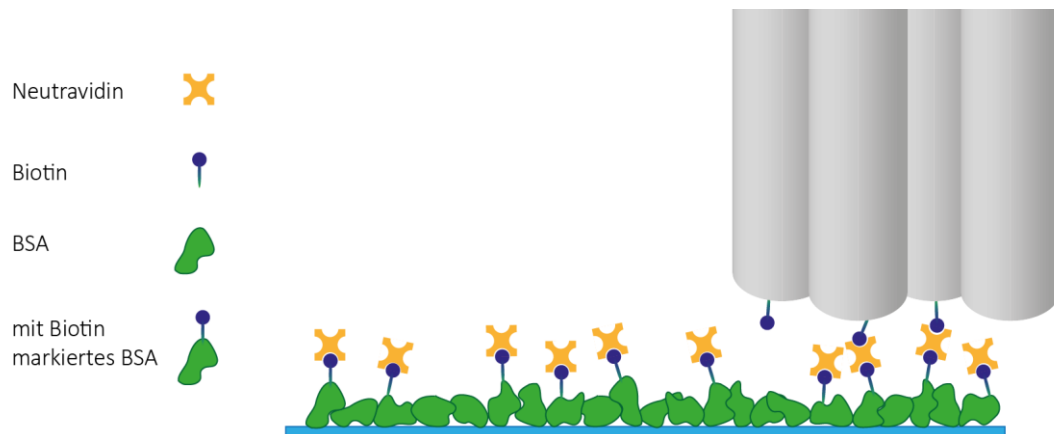


Abbildung 42: BSA-Biotin-Oberfläche zur Anbindung von DNA-Origami über Neutravidin.

Die Immobilisierung von DNA-Origami in LabTeks und Flusskammern kann entweder elektrostatisch erfolgen oder durch Anbindung über Proteine.

Für die Anbindung über Proteine wird das gereinigte Glas mit 1 mg/ml Albumin aus bovinem Serum (BSA, Sigma-Aldrich) und 0,5 mg/ml an BSA gekoppeltem Biotin (Sigma-Aldrich) in 1xPBS (P4417-100TAB, Sigma-Aldrich) für drei Stunden inkubiert. Das BSA soll die Oberfläche passivieren, während das BSA-Biotin als Anbindestelle fungiert. Anschließend wird das Glas dreimal mit 1xPBS gewaschen und für eine halbe Stunde mit 0,1 mg/ml Neutravidin (Thermo Scientific) in 1xPBS versetzt. Nicht gebundenes Neutravidin wird anschließend mit 1xPBS von der Probe gespült. Da Neutravidin vier Anbindestellen für Biotin hat, kann die Probe über ein weiteres Biotin, welches sich an der Probe befindet, an das Neutravidin gebunden werden. Die verwendete Konzentration an Probe liegt je nach Anwendung im Bereich von 5 bis 10 pM und resultiert in unterschiedlich dichten Oberflächen. Die Vollständigkeit der Anbindung wird über Fluoreszenzmikroskopie überprüft und

die Oberfläche wird mit 1xPBS gespült, sobald eine ausreichende Oberflächendichte erreicht ist. Die Anbindung ist in Abbildung 42 dargestellt.

Für die Messungen der säulenförmigen DNA-Struktur werden nach der Immobilisierung des DNA-Origami die mNP an diese angebunden. Dazu wird zunächst die Oberfläche mit 1 mg/ml BSA oder alternativ SuperBlock™ (ThermoFisher Scientific) gesättigt, um unspezifische Bindungen an das Glas zu vermeiden. Nach Spülen der Kammer mit 1xPBS werden die mit DNA funktionalisierten mNP in die Kammer gefüllt. Die Konzentration dieser wird durch Verdünnen bis zu einer Absorption von 0,05 bis 1 (NanoDrop2000, Thermo Scientific) eingestellt (1xTAE, 11 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl). Die Probe wird zwei Tage lang bei 4°C inkubiert und anschließend drei- bis fünfmal mit Puffer (1xTAE, 11 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen, um ungebundene mNP zu entfernen.

Die säulenförmige DNA-Struktur kann nicht in Lösung an die mNP angebunden werden, da es dabei zu einer Aggregatbildung kommt. Prinzipiell könnten die Aggregate von den Monomeren und Dimeren durch Gel-Elektrophorese getrennt werden, dies ist jedoch bei dem verwendeten DNA-Origami und den großen (100 nm) mNP nicht möglich.

### 3.3.4. Lösungssynthese

Eine zweite Variante Nanoantennen herzustellen und an Glas zu binden ist die Lösungssynthese mit elektrostatischer Anbindung, die abgewandelt von Prinz et. al 2016 [76] durchgeführt wurde. Bei dieser werden die rechteckigen DNA-Origami mit den mNP in einem 1:1-Verhältnis in einem 1xTAE-Puffer mit 11 mM MgCl<sub>2</sub> gemischt (~0,6 nM), aufgeheizt auf 45°C und alle zwei Minuten um 3°C bis auf 25°C abgekühlt. Die fertige Probe enthält ungebundene DNA-Origami, Monomere, Dimere und Aggregate. Um die Monomere und Dimere von dem Rest zu trennen wird eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Probe wird im Verhältnis 6:1 (v/v) mit Ladepuffer (30% Glycerin, 0,025% Bromphenolblau) in die Geltaschen (0,75% Agarose, 11 mM MgCl<sub>2</sub>, 1xTAE) gefüllt und mehrere Stunden laufen gelassen. Die Spannung wird dabei zunächst für eine Stunde bei 30 V gehalten und sukzessive erhöht bis eine ausreichende Trennung im Gel ersichtlich wird (Abbildung 43).

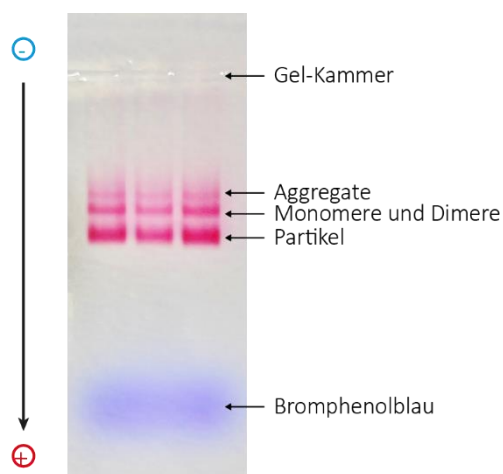


Abbildung 43: Gel-Auftrennung der mNP-DNA Monomere und Dimere.

Die Bande mit Monomer und Dimer wird aus dem Gel ausgeschnitten, zwischen zwei mit Parafilm umwickelten Objektträgern ausgedrückt und anschließend auf einem Deckglas elektrostatisch angebunden. Das Deckglas wurde zuvor mit Ethanol

gereinigt und fünf Minuten unter UV-Licht aktiviert. Im Anschluss wird eine Flusskammer mit einem gereinigten Objektträger, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, gebaut.

### 3.3.5. Photostabilisierung von Farbstoffmolekülen

Zur Stabilisierung der Farbstoffmoleküle wird ein Sauerstoffentzugssystem in Kombination mit einem reduzierenden und oxidierenden System (ROXS) verwendet. Für den Sauerstoffentzug werden 50 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 7,5, TRIZMA® Base, Sigma) mit 12,5 mM Kaliumchlorid (Roth), 30% (v/v) Glycerin (Roth), 1 mg/ml Glukose-Oxidase (Type VII, G2133-10KU, Sigma Aldrich), 50 µg/ml Katalase (Bovine Liver, C100-50 MG, Sigma Aldrich) verwendet. Dies wird im Verhältnis 1:10 zum Messpuffer hinzugefügt. Dieser besteht aus 2 mM Trolox/Troloxquinon als Redoxsystem und 1% D-(+)-Glukose (Sigma) in 1xPBS.

Für die Herstellung von Trolox/Troloxquinon werden 2 mM Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure, Sigma Aldrich) mit 1% Glukose in 1xPBS gelöst. Die Lösung wird für 10 bis 15 Minuten unter eine UV-Lampe gelegt und stichprobenartig am Absorptionsspektrometer (NanoDrop2000, Thermo Scientific) gemessen. Trolox hat ein Absorptionsmaximum bei etwa 290 nm während das Troloxquinon, welches durch die Reaktion von Trolox mit Sauerstoff unter UV-Licht entsteht, bei etwa 265 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Sobald die Absorbanz des Troloxquinons äquivalent zu der des Trolox' ist, wird die Reaktion durch Ausschalten der UV-Lampe beendet.



## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. DNA-Origami basierte molekulare Kraftklammer

Im Rahmen der Promotion wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Professor Tim Liedl von der LMU München, nanoskopische Kraftklammern untersucht, die auf einem DNA-Origami Grundgerüst basieren. Alle Proben wurden von Philipp Nickels im Rahmen seiner Doktorarbeit ([https://edoc.ub.uni-muenchen.de/20766/1/Nickels\\_Philipp.pdf](https://edoc.ub.uni-muenchen.de/20766/1/Nickels_Philipp.pdf), (online: Dezember 2017) entworfen, hergestellt und mittels eines Elektronenmikroskops und Gel-Elektrophorese auf Vollständigkeit überprüft (siehe Abbildung A 13 und [11]). Die DNA-Origami basierte molekulare Kraftklammer besteht aus einer in die Breite gezogenen Klammer-förmigen Basis (Abbildung 44), die robust ist gegen Spannungen, die durch Anlegen einer Kraft auftreten. Diese Robustheit konnte durch TEM-Aufnahmen von Proben mit einer angelegten Kraft von 0 pN bis 12 pN bestätigt werden (siehe Abbildung A 13). Der zirkuläre Gerüststrang, aus dem das DNA-Origami gefaltet wird, verläuft durch das gesamte DNA-Origami und tritt in der Mitte aus diesem aus, um als einzelsträngige DNA die beiden Seiten der Kraftklammer miteinander zu verbinden. Der Gerüststrang (M13mp18, 7249 Nukleotide) wird so in dem DNA-Origami verbaut, dass sich der Polylinker (engl. *multiple cloning site*) in der Mitte der Feder befindet. So ist es möglich diesen Teil des Gerüststranges zu klonieren, um je nach Anforderung der zu untersuchenden Probe, die DNA-Sequenz anzupassen. Die Kraftklammer ist 80,90 nm lang und hat eine Öffnung von 42,84 nm (berechnete Werte), in der sich die einzelsträngige DNA befindet. Steven Smith et al. zeigten im Jahr 1996, dass eine einzelsträngige DNA als entropische Feder angenähert werden kann, deren Federkonstante abhängig von der Länge der DNA, also der Anzahl an Basen, ist [4]. Durch Verkürzen des DNA-Stranges kann so eine Erhöhung der Kraft erhalten werden. Dabei werden insgesamt zehn Hefstränge ausgetauscht, die sich rechts und links von der Kraftklammer befinden und so an den Gerüststrang binden, dass nur ein vorausberechneter Teil dessen sich als Feder in der Klammer befindet. Überschüssiger Gerüststrang wird in Vorräte (Reservoirs) rechts und links von der Kraftklammer geschoben. Mit dem Austausch von den zehn Hefsträngen kann der Gerüststrang also im Bereich der Feder verkürzt oder verlängert werden, was zu einer Erhöhung oder Verringerung der Kraft führt. Da die Hefstränge bereits während der Faltung zugegeben werden, muss für jede Kraft ein eigenes DNA-Origami gefaltet werden. Die Änderung der Kraft ist so nach der Faltung nicht mehr möglich.

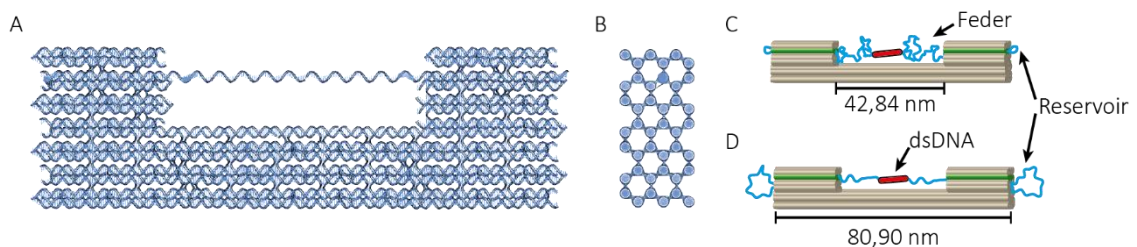


Abbildung 44: PDB-Darstellung der Kraftklammer-Struktur von vorne (A) und von der Seite (B). C, D) Schematische Darstellung der Kraftklammer. Die Gesamtlänge beträgt 80,90 nm und die Länge des Bereichs zwischen den Klammern 42,84 nm. Rechts und links befinden sich die Reservoirs an Gerüststrang. Die grün eingefärbten Bereiche stellen die zehn Hefstränge dar, die durch Austausch die Kraft verändern. Um die Kraft zu erhöhen werden Teile des Gerüststrangs aus der entropischen Feder entfernt und im Reservoir gespeichert (D).

#### 4.1.1. Das Modell der frei beweglichen Kette

Für die Berechnung der Kraft wurde das Modell der frei beweglichen Kette (engl. *Freely-Jointed-Chain*) von Smith et al. verwendet [4] (Formel (52)). Diesem liegt die Annahme zugrunde, dass die einzelsträngige DNA (ssDNA) als entropische Feder betrachtet werden kann. Wird diese von beiden Enden aus gestreckt, kann die ausgeübte Kraft  $F$  als Funktion über den Abstand der beiden Enden  $d(F)$  gemessen werden. Dabei ist die Kraft, die jede Untereinheit erfährt, äquivalent zu der eingesetzten Kraft. Für das Modell wird die DNA als ein Kettenpolymer angenommen, das aus mehreren voneinander unabhängig orientierten und nicht miteinander wechselwirkenden Untereinheiten, den Kuhn-Segmenten besteht. Für einzelsträngige DNA entspricht die Länge eines Kuhn-Segments  $l_K$  der doppelten Persistenzlänge (1,5 nm [4]) und beschreibt somit die Steifigkeit des Polymers. Die ssDNA hat bei vollständiger Streckung eine Konturlänge  $L_C$ , die der Anzahl an Basen  $N$  entspricht, aus der sie aufgebaut ist ( $L_C = N \cdot L_B$ ).  $L_B$  ist die Länge einer einzelnen Base (0,63 nm  $\pm$  0,8 nm, [72]). Die Boltzmannkonstante  $k_B$  mit der Temperatur  $T$  bezieht in das Modell mit ein, dass die DNA alle möglichen Konformationen mit gleicher Wahrscheinlichkeit einnehmen kann.  $S$  ist das Stretchmodul, welches 800 pN entspricht [4]. Der Abstand  $d(F)$  zwischen den Enden der ssDNA ist durch die Kraftklammer gegeben und beträgt 42,84 nm, da der Bereich zwischen den Klammern aus 126 Basenpaaren mit einer Basenpaarlänge von 0,34 nm besteht.

$$d(F) = L_C \cdot \left[ \coth\left(\frac{F \cdot l_K}{k_B \cdot T}\right) - \frac{k_B \cdot T}{F \cdot l_K} \right] \cdot \left(1 + \frac{F}{S}\right) \quad (52)$$

Weitere Annahmen, die für die Berechnung der Kraft getroffen werden, sind, dass sekundäre Strukturen der ssDNA vernachlässigbar sind und die Kraft-Fluktuationen durch die Konformationsänderungen der ssDNA auf einer Zeitskala vonstaten geht (niedriger Mikrosekundenbereich), die auf die Messungen (Mittelung über Millisekunden) keinen Einfluss haben.

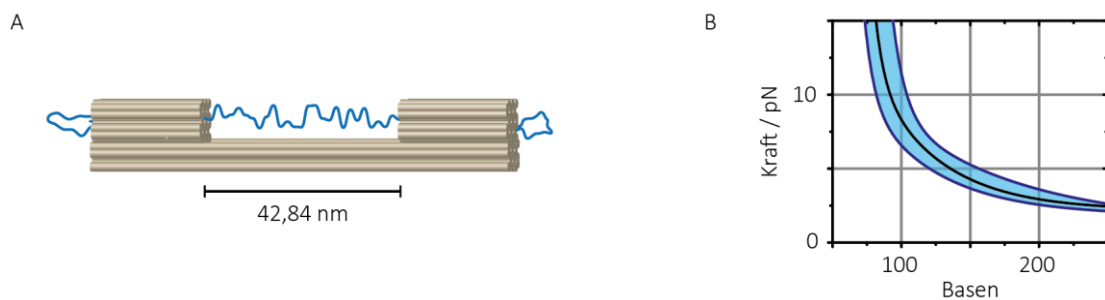


Abbildung 45: A) Darstellung der nanoskopischen Kraftklammer mit dem Gerüststrang der Länge von 7249 Nukleotiden. Der einzelsträngige Bereich ist 42,84 nm lang, vorgegeben durch den Abstand zwischen den beiden festen Seitenteilen. B) Kraft als Funktion von der Anzahl an Basen in der Feder. Der transparente blaue Bereich ist der Fehlerbereich, der durch die Standardabweichung der einzelnen Basenlängen zustande kommt.

Da der Gerüststrang nur eine begrenzte Anzahl an Basen hat, die aus dem Reservoir in die Feder gezogen werden können, ist es nicht möglich, eine 0 pN Probe herzustellen. Darum wird die Feder auf einer Seite enzymatisch geschnitten.

#### 4.1.2. Holliday Junction

Um zunächst die Kraftklammer auf ihre Funktionalität und Sensitivität zu überprüfen, wurde die Holliday Junction verwendet. Diese ist ein gut studiertes Biomolekül, das bereits 2007 von Hohng et al. auf sein Kraftverhalten hin untersucht wurde. Sie besitzt eine hohe Sensitivität bezüglich von außen angelegter Kräfte.

Die Holliday Junction hat vier Arme, die jeweils aus zwei gepaarten ssDNA Strängen bestehen (siehe auch 2.2). Um diese in die Kraftklammer einzubringen, wurde der Gerüststrang so modifiziert, dass ein Teil der Holliday Junction sich innerhalb der Feder befindet. Die Sequenzen der gesamten Holliday Junction sind unten aufgeführt. Dabei ist **x** der Bereich im Gerüststrang und **r**, **b** und **h** sind DNA-Stränge, die zusammen mit den Heftsträngen der Faltung zugegeben werden. Alle Arme sind elf Basenpaare lang und sollten damit zu einer gleichverteilten Wahrscheinlichkeit führen, dass die Holliday Junction im Iso-I und Iso-II Zustand vorliegt. Die Sequenzen b und h sind jeweils mit einem Farbstoff markiert, um die Konformationswechsel über den Förster-Resonanz-Energie-Transfer beobachten zu können.



Als Donormolekül wurde Cy3 verwendet und als Akzeptormolekül Cy5. Diese sind zwar unter Bestrahlung mit Laserlicht in reinem Puffer instabil, können jedoch durch Verwendung eines Sauerstoffentzugssystems in Kombination mit einem reduzierenden und oxidierenden System (ROXS) (siehe 3.3.5) ausreichend stabilisiert werden, um Spuren über mehrere Minuten aufzunehmen. Der Abstand der beiden Farbstoffmoleküle zueinander beträgt in der offenen Konformation etwa 7,8 nm (Abbildung 46 A und B). In diesem Fall liegt ein Winkel von 90° zwischen den beiden Farbstoffmolekülen vor. Die beiden Konformere Iso-I und Iso-II nehmen jeweils einen 60°-Winkel ein [77]. Dies resultiert in einem Abstand von 5,7 nm für die Iso-II Holliday Junction und 9,9 nm für die Iso-I Holliday Junction, entsprechend einer FRET-Effizienz von 0,57 (Iso-II) und 0,05 (Iso-I). Für die Berechnung des Abstands wurde der Kosinus-Satz verwendet und eine Annäherung für die Linkerlänge (1,0 nm), die Farbstoffgröße (1,0 nm) und den Versatz von der Helix (0,5 nm) getroffen:

$$a^2 = b^2 + c^2 - 2bc \cdot \cos(\alpha) \quad (53)$$

Da das Einbringen der Holliday Junction in die Feder den einzelsträngigen Bereich verkürzt, müssen die Kräfte neu berechnet werden. Zur Vereinfachung wird zunächst der Übergangszustand, also die offene Konformation, als Ausgang zur Berechnung der Kraft verwendet. Durch die Breite von 7,8 nm verkürzt sich der Bereich der ssDNA von 42,84 nm auf 35,04 nm. Mit diesem Wert wird analog zu 4.1.1 die Kraft in Abhängigkeit von der Anzahl der Basen berechnet (Abbildung 46 C). Ausgewählt wurden zusätzlich zu der 0 pN Probe drei weitere: 1,2 pN (400 Basen), 2,5 pN (202 Basen) und 4,0 pN (136 Basen). Um zu evaluieren, wie groß der Einfluss der ständigen Konformationsänderungen auf die Kraft ist, wurde für die drei Kraftproben die Kraft in iso-I und iso-II berechnet. Wie anhand der Abbildung 46 D zu erkennen ist, ist die Fluktuationsänderung größer bei höherer Kraft, insgesamt aber kleiner als 10%.

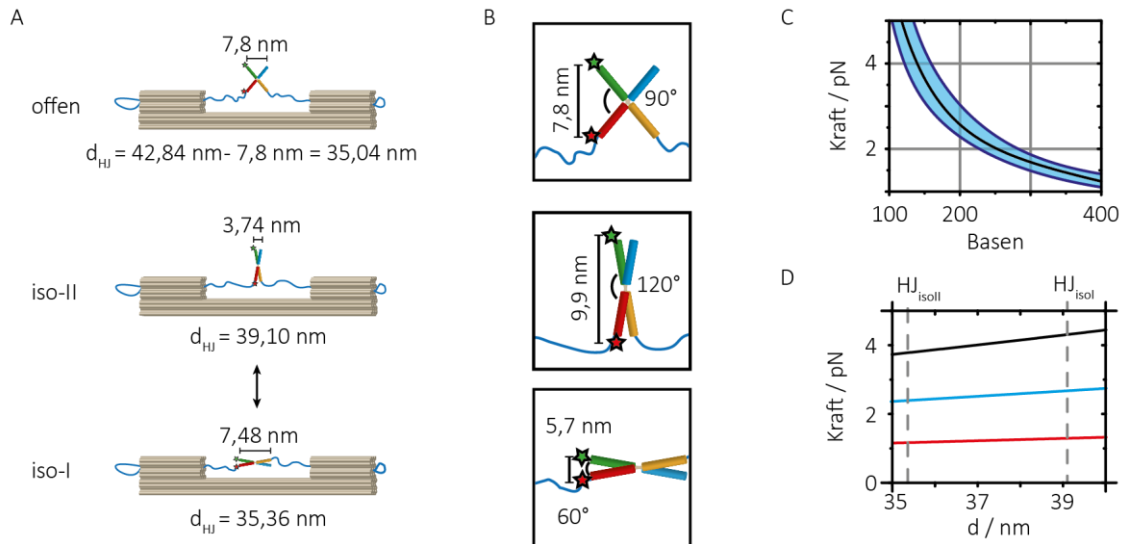


Abbildung 46: A) Schematische Darstellung der DNA-Origami-Kraftklammer mit Holliday Junction.  $d_{HJ}$  stellt die Breite der einzelsträngigen DNA dar nach Abzug der Holliday Junction von der Breite der Öffnung. Die Holliday Junction befindet sich in der offenen Konformation solange, bis ausreichend Magnesiumchlorid vorhanden ist. Dieses führt dazu, dass sie zwischen den Konformationen iso-I und iso-II wechselt. In B) sind die Winkel aufgetragen, die die Holliday Junction einnehmen kann, sowie auch die daraus resultierenden Abstände zwischen den Farbstoffmolekülen. C) Auftragung der resultierenden Kraft in Abhängigkeit von der Anzahl an Basen in der ssDNA Feder für die offene Konformation. Der transparente blaue Bereich ist der Fehlerbereich, der durch die Standardabweichung der einzelnen Basenlängen zustande kommt. D) Der Wechsel zwischen den beiden Konformationen führt zu einer Veränderung des Abstands  $d_{HJ}$ . Die Auswirkung auf die Kraft in Bezug auf den Abstand ist dargestellt.

Für die Untersuchung der Proben wurden diese jeweils auf einer BSA-Biotin-Neutravidin-Oberfläche (siehe 3.3.3) über die Biotin-Moleküle der Struktur immobilisiert und die Intensität für jedes einzelne Molekül in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet (siehe Abbildung 47 A). Für die Messungen der FRET-Effizienzen wurde das in 3.1.2 beschriebene Einzelmolekül-fluoreszenzmikroskop verwendet. Die Messungen wurden in einem photostabilisierenden Puffer (siehe 3.3.5) gemessen, zu dem zusätzlich 100 mM Magnesiumchlorid hinzugefügt wurde, um die Konformationsänderungen der Holliday Junction einzustellen.

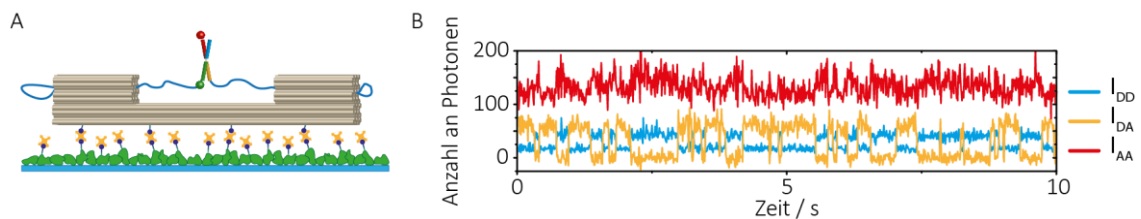


Abbildung 47: A) Immobilisierung der DNA-Origami-Kraftklammer auf einer BSA-Biotin-Oberfläche. B) Beispiel einer Intensitäts-Zeit-Spur für ein Molekül der Kraft von 0 pN. Rot: Akzeptor-Detektion nach Akzeptor-Anregung, gelb: Akzeptor-Detektion nach Donor-Anregung, blau: Donor-Detektion nach Donor-Anregung.

Der Hintergrund wurde aus der Messung der Oberfläche nach Bleichen der Farbstoffmoleküle erhalten und von den entsprechenden Spuren subtrahiert ( $Bkgr_{DD} = 14,7$  Hz,  $Bkgr_{DA} = 31,3$  Hz,  $Bkgr_{AA} = 11,0$  Hz). Die weiteren Korrekturfaktoren wurden wie in 3.2.2 beschrieben berechnet. Das Übersprechen in den roten Kanal lag bei 18,8% und die direkte Anregung des roten Farbstoffmoleküls bei 22,4%. Der für die Korrektur verwendete Gamma-Faktor lag bei 4,48 (Abbildung A 14).

Damit ergeben sich Gamma-korrigierte FRET-Effizienzen von  $0,08 \pm 0,05$  und  $0,52 \pm 0,08$  für die freie Holliday Junction und  $0,05 \pm 0,03$  und  $0,51 \pm 0,07$  für die in die Kraftklammer eingespannte Holliday Junction. Dies entspricht Abständen von  $9,0 \text{ nm} \pm 1,0 \text{ nm}$ ,  $5,9 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$ ,  $9,8 \text{ nm} \pm 1,0 \text{ nm}$  und  $6,0 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$ . Die Plots für die Stöchiometrie gegen die FRET-Effizienz sind in Abbildung 48 A für die freie Holliday Junction und die 0 pN-Probe dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, dass die freie Holliday Junction minimal breitere Verteilungen hat, was vermutlich damit zusammenhängt, dass sie keinen verlängerten X-Strang hat, der im Fall der DNA-Origami Kraftklammer ein Teil des Gerüststranges ist. Die gemessenen FRET-Effizienzen sind nahe an den berechneten FRET-Effizienzen (siehe Abbildung 48 B), was insgesamt dafür spricht, dass die Holliday Junction den erwarteten Winkel von  $60^\circ$  einnehmen kann.

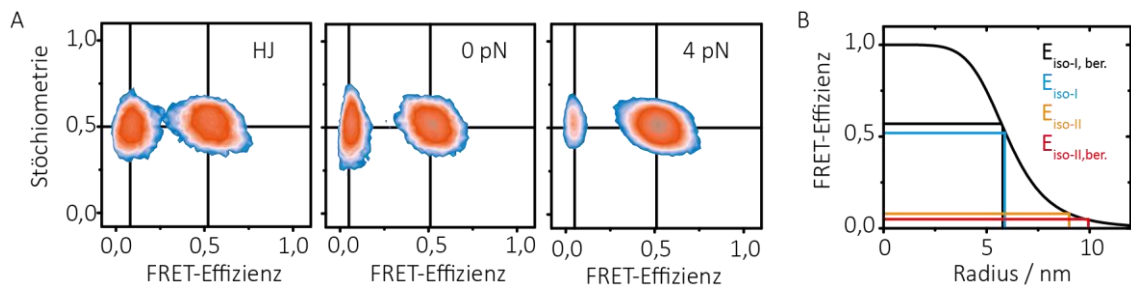


Abbildung 48: A) Auftragung der Stöchiometrie-Werte aller Moleküle gegen die FRET-Effizienz für die HJ alleine und in der Kraftklammer bei 0 pN und 4 pN. B) Auftragung der FRET-Effizienz gegen den Abstand zwischen Cy3 und Cy5. Eingetragen wurden die berechneten FRET-Effizienzen für die Zustände iso-I (schwarz) und iso-II (rot) sowie die gemessenen FRET-Effizienzen für iso-I (blau) und iso-II (gelb).

Für jede Kraft wurden Intensitäts-Zeit-Spuren für jedes einzelne Molekül auf der Oberfläche aufgenommen. In die Analyse einbezogen wurden nur solche, bei denen beide Farbstoffmoleküle ein Signal lieferten und bei denen mehr als drei Übergänge vorhanden waren, bevor Photobleichen eintrat. Da die Anzahl an Übergängen pro Zeit mit Zunahme der Kraft abnahm (siehe Abbildung 49 A), wurden für die Probe mit 0 pN nur 40 Moleküle untersucht während bei der 4 pN Probe doppelt so viele Moleküle (74) in die Analyse aufgenommen werden mussten. Die Integrationszeit betrug 10 ms und insgesamt wurden mehrere Tausend Übergänge beobachtet. Wie in den Spuren zu sehen ist, nimmt die Anzahl an Übergängen bei Erhöhung der Kraft ab und zwingt die Holliday Junction in den iso-I Zustand (hoher FRET). Zur Kontrolle, dass die Kraftklammer keinen Einfluss, außer der gewollt angelegten Kraft, auf das zu untersuchende System hat, wurde die Holliday Junction durch Anbinden an Glas über Biotin untersucht. Bei dieser befand sich das Biotin an dem Oligonukleotid, das anstelle des Gerüststrangs verwendet wurde (Strang X). Der Vergleich zwischen der Probe mit 0 pN und der Holliday Junction ohne Kraftklammer führte zu vernachlässigbaren Unterschieden (siehe Abbildung 49 A und B). Die korrigierten FRET-Effizienzen für alle Proben wurden in einem Histogramm dargestellt (Abbildung 49 B) aus dem zu erkennen ist, dass die Holliday Junction durch Anlegen einer Kraft in die Konformation iso-I gezwungen wird. Durch Anwendung des Hidden-Markov-Modells (siehe 3.2.2) konnten zunächst die mittleren Verweildauern der Moleküle im iso-I bzw. iso-II Zustand erhalten werden (siehe Abbildung A 15) aus denen anschließend die Übergangsraten von iso-I nach iso-II  $k_{I \rightarrow II}$  bzw. iso-II nach iso-I  $k_{II \rightarrow I}$  berechnet wurden (siehe Abbildung 49 D). Für den Übergang iso-I nach iso-II ergaben sich steigende Übergangsraten von  $4,7 \text{ s}^{-1} \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$  für die 0 pN Probe bis  $18,2 \text{ s}^{-1} \pm 1,4 \text{ s}^{-1}$  für die 4 pN Probe. Hingegen für den Übergang iso-II nach iso-I sanken die Übergangsraten von  $3,2 \text{ s}^{-1} \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$  bei 0 pN zu  $1,7 \text{ s}^{-1} \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$  bei 4 pN.

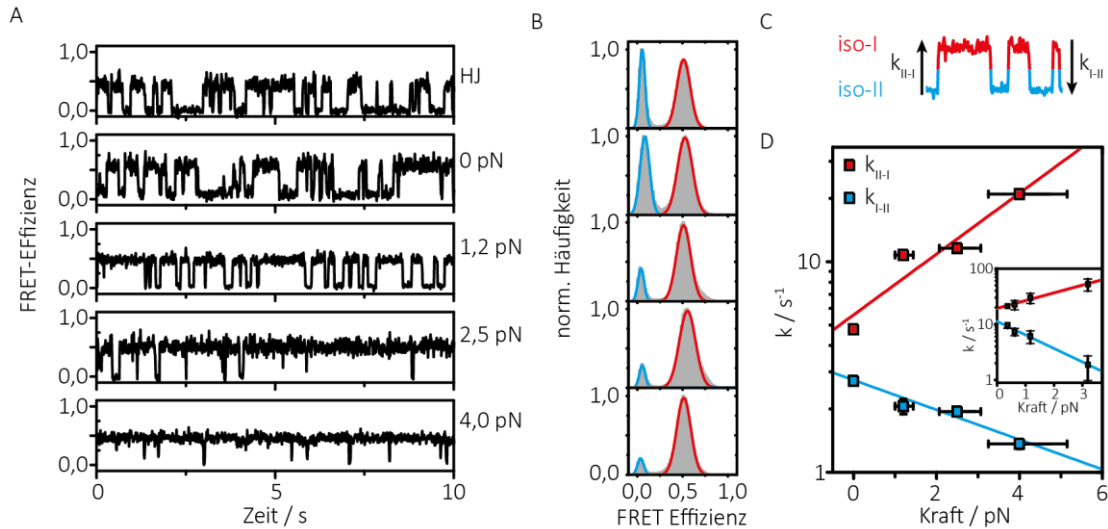


Abbildung 49: A) Beispiele für korrigierte FRET-Effizienz-Zeit-Spuren für die Holliday Junction außerhalb und innerhalb der Kraftklammer von 0 pN bis 4 pN. B) Histogramme über die korrigierten FRET-Effizienzen aller Moleküle der jeweiligen Probe aus A). C) Auftragung der Übergangsraten von Iso-I zu Iso-II (blau) und Iso-II zu Iso-I (rot). Die Fehlerbalken der Kraft kommen durch den Standardfehler der einzelnen Basenlängen und der Kraftänderung durch die Abstandsänderung durch die Konformationsänderungen der Holliday Junction. Die y-Fehler sind die Standardfehler der exponentiellen Anpassungsfunktionen. Die verkleinerte Darstellung in D) stellt die Vergleichswerte aus der Publikation von Hohng et al. [1] für die HR-Junction dar.

Um die Funktionalität des Systems zu überprüfen können die Messergebnisse mit denen von Hohng et al. [1] verglichen werden, der die Kraftabhängigkeit der Holliday Junction über optische Pinzetten bestimmte. Die gewählte Holliday Junction entspricht in ihrem Verhalten der HR-Junction aus der Publikation von Hohng [1] mit der Ausnahme, dass in der Publikation der Arm h die Verbindung zur dielektrischen Kugel darstellt während der Arm r über Biotin an eine Glas-oberfläche gebunden ist (siehe Abbildung 50). Zudem ist der Abstand zwischen dem grünen und dem roten Farbstoff verändert, da beide Farbstoffmoleküle an die gleiche Sequenz (5' und 3') gebunden sind. Bei der HR-Junction verschiebt sich das Gleichgewicht, ebenso wie bei der in der Kraftklammer, bei Erhöhung der Kraft zur höheren FRET-Population. Dies geht damit einher, dass die Übergangsraten von iso-II nach iso-I zunehmen, während die Übergangsraten von iso-I nach iso-II abnehmen. Die Tendenz stimmt gut mit den Messungen von Hohng überein. Unterschiede können durch die leicht veränderte Geometrie der Probe zustande kommen, sowie auch durch unterschiedliche Konzentrationen an Magnesiumchlorid, da die Menge an Magnesiumchlorid in der Lösung die Übergangsraten stark beeinflusst. Hohng et al. verwendeten lediglich 10 mM wohingegen im Fall der Kraftklammer 100 mM Magnesiumchlorid eingesetzt worden sind.

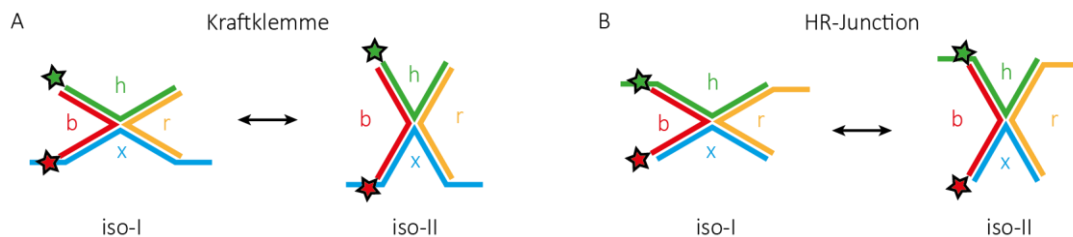


Abbildung 50: Vergleich der Holliday Junction in der DNA-Origami Kraftklammer (A) mit denen aus dem Paper von Hohng [1] (B).

Um zu zeigen, dass die Kraftklammer keinen Einfluss auf die Dynamik der Holliday Junction hat, wurde weiterhin noch eine logarithmische Auftragung der Übergangsraten  $k_{\text{H}}$  gegen  $k_{\text{H}}$  vorgenommen (Abbildung A 16). In der Abbildung A 15 ist deutlich zu sehen, dass die Heterogenität der Holliday Junction [1] erhalten bleibt.

#### 4.1.3. TATA-Box bindendes Protein

In diesem Kapitel wird die Verwendung der DNA-Origami Kraftklammer zur Untersuchung des Knickens von DNA durch das archaelle TATA-Box bindende Protein (TBP) beschrieben. Das TBP wurde von Dr. Sarah Schulz aus dem hyperthermophilen archaellen Organismus *Methanocaldococcus janaschi* (MjTBP) exprimiert und aufgereinigt, wie in [78] beschrieben. Der Gerüststrang wurde so modifiziert, dass sich in der Mitte der Feder eine T und A reiche Sequenz befindet (TTTAAATA), an die das TBP anbinden kann. Die Synthese des Gerüststranges und des DNA-Origamis wurde ebenso wie die der anderen DNA-Origami Kraftklammern von Philipp Nickels aus München durchgeführt. Die Syntheseschritte befinden sich in den Zusatzinformationen zu der Veröffentlichung [11].

An den ungebundenen Gerüststrang in der Öffnung der DNA-Origami-Kraftklammer wird ein synthetisierter komplementärer DNA-Strang hybridisiert, um einen doppelsträngigen Bereich für das TBP zu erhalten (Abbildung 51 A).

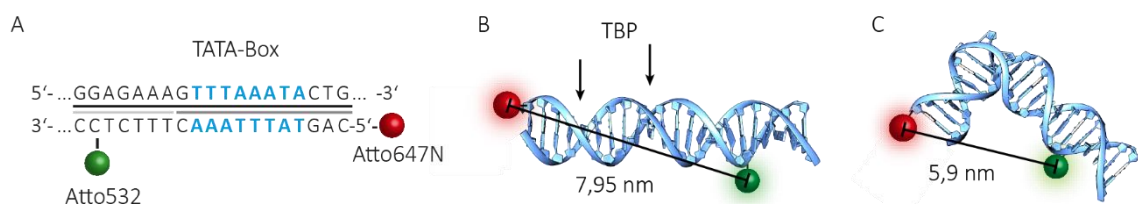


Abbildung 51: A) Sequenz der TATA-Box in der DNA-Origami Kraftklammer. B) PDB-Darstellung der TATA-Box im geraden Zustand und C) PDB-Darstellung der geknickten TATA-Box. Die Pfeile zeigen die Bereiche an denen das TBP an die DNA bindet.

Als Donor-Farbstoff wurde Atto532 verwendet und als Akzeptormolekül Atto647N. Atto647N hat zwar zwei Helligkeitszustände, da allerdings der dunklere Zustand photoinduziert ist [33], tritt dieser bei Lösungsmessungen kaum auf und wird durch den ALEX-2CDE-Filter aus den Messdaten entfernt. Die Farbstoffmoleküle wurden rechts und links von der TATA-Box angebracht, um eine Abstandsänderung bei Knicken der DNA beobachten zu können. Der Abstand zwischen den beiden Farbstoffmolekülen beträgt 17 Basenpaare, sodass die Farbstoffmoleküle im geknickten und geraden Zustand der DNA miteinander über den Förster-Resonanz-Energie-Transfer agieren können. Für den exakten Abstand der beiden Farbstoffmoleküle müssen noch die Linkerlänge und die Orientierung der Farbstoffmoleküle an der Doppelhelix beachtet werden, sodass sich unter Verwendung des in Kapitel 2.2 beschriebenen Rechenweges ein Abstand von 7,95 nm ergibt. Unter Verwendung des tabellierten Wertes für den Förster-Radius von 5,9 nm [79] können die zu erwartenden FRET-Effizienzen berechnet werden. Für die gerade DNA ergibt sich ein Wert von 0,14.

Für die Berechnung des Abstands bei geknickter DNA wird für eine grobe Näherung der Satz des Pythagoras verwendet. Mit der Korrektur um die Linkerlänge, die Farbstoffgröße und den Versatz von der Helix ergibt sich ein Abstand der beiden Farbstoffmoleküle zueinander von ~5,39 nm. Dies wiederum liefert eine FRET-Effizienz von 0,63.

Da die Hybridisierung eines Teils der Feder zu einer Verkürzung des einzelsträngigen Bereiches führt (Abbildung 52 A), müssen die an der DNA-Origami-Kraftklammer angelegten Kräfte neu berechnet werden. Der doppelsträngige Bereich besteht



aus 51 Basenpaaren und hat somit eine Länge von 17,3 nm. Damit verkürzt sich der Bereich der Feder von 42,8 nm auf 25,5 nm. Die berechnete Kraft-Abstands-Kurve befindet sich in Abbildung 52 B. Sobald das TBP anbindet und die DNA knickt verkürzt sich die Länge des doppelsträngigen Bereichs und die Länge der Feder vergrößert sich auf 28,0 nm. In Abbildung 52 C ist der Einfluss der Abstandsänderung auf die Kraft dargestellt. Das Knicken durch das TBP sorgt dafür, dass die angelegte Kraft sich stark verringert. Die maximale Fluktuation auf die Kraft liegt dabei bei etwa 17%.

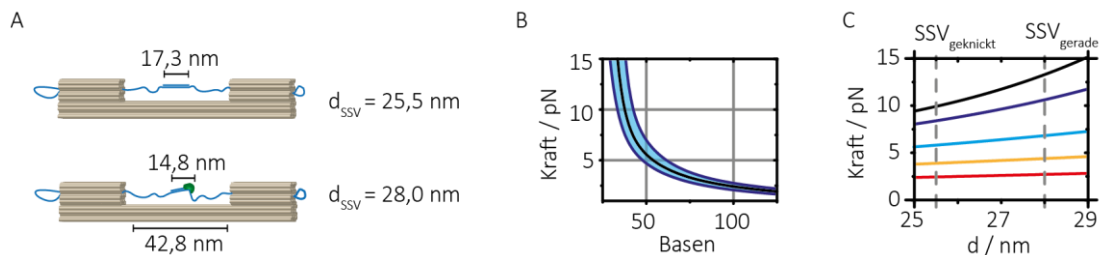


Abbildung 52: A) Schematische Darstellung der DNA-Origami-Kraftklammer ohne und mit TBP.  $d_{SSV}$  stellt die Breite der einzelsträngigen DNA dar nach Abzug der TATA-Box von der Breite der Öffnung. Das Anbinden des TBP führt zu einer Verlängerung des einzelsträngigen Bereichs. B) Auftragung der resultierenden Kraft in Abhängigkeit von der Anzahl an Basen in der ssDNA Feder für die gerade DNA. Der transparente blaue Bereich ist der Fehlerbereich, der durch die Standardabweichung der einzelnen Basenlängen zustande kommt. C) Das An- und Abbinden des TBPs führt zu einer Veränderung des Abstands  $d_{SSV}$ . Die Auswirkung auf die Kraft in Bezug auf den Abstand ist dargestellt.

Das TATA-Box-bindende Protein wird, um eine ausreichende statistische Verteilung zu erhalten, in Lösung gemessen. Die Anregungslaser wurden mit einer Frequenz von 10 kHz alterniert und die Leistungen so eingestellt, dass der S-Wert für die nicht korrigierten Proben bei 0,5 liegt (532 nm: 50  $\mu$ W, 640 nm: 93  $\mu$ W). Für die Auswertung wurden die Parameter so gewählt, dass alle Bursts als solche detektiert werden konnten ( $T = 500$   $\mu$ s,  $M = 30$ ,  $L = 100$ ). Für die Messungen wurden spezielle Eigenbau-Kammern verwendet, die aus einem Deckglas unter einem Teflon-Ring bestehen, der mit Aluminium ummantelt ist. Die Probenkammer beinhaltet ein Volumen von  $\sim 60$   $\mu$ l, welche den Vorteil hat, dass nicht zu viel von dem Protein pro Messung verwendet werden muss. Die Deckgläser wurden mit 1 M KOH gereinigt und mit 10 mg/ml BSA zehn Minuten lang inkubiert. Das BSA bindet an die Glasoberfläche und passiviert diese. Der Puffer, in dem die Probe gemessen wurde, bestand aus 1xPBS (pH 7) mit 1 M NaCl und 12,5 mM  $MgCl_2$ . Das Magnesiumchlorid stabilisiert die Kraftklammer, während das Natriumchlorid die Bindung zwischen dem TBP und der TATA-Box verstärkt. Die Konzentration der eingesetzten Kraftklammer lag bei wenigen piko-molar, sodass nie mehrere Moleküle gleichzeitig durch den Fokus diffundieren. Da die Dissoziationskonstante von TBP bei  $K_D = 48$  nM liegt [2] wurde 1 mM TBP verwendet, um die Wahrscheinlichkeit zu maximieren, dass ein sich im Fokus befindendes Molekül TBP in der unmittelbaren Umgebung hat. Das verwendete Setup (siehe 3.1.2) beinhaltete ein beheizbares Objektiv, das die Probe bis auf 35°C heizen konnte. A. Gietl et al. zeigten, dass die Bindung des TBPs an die DNA stark temperaturabhängig ist und um den Faktor 3 steigt, wenn nicht bei Raumtemperatur, sondern 50°C gemessen wird [2]. Die höhere Temperatur führt zu einer dazu, dass die Kollisionsrate durch eine schnellere Diffusion der Teilchen erhöht wird und mehr TBP binden kann. Zum anderen erhöht sich vermutlich auch die Knick-Rate des an die DNA assoziierten TBPs bei höherer Temperatur. Die Zeit, die das TBP die DNA knickt bleibt jedoch gleich.

Es wurden sechs Proben mit Kräften zwischen 0 pN und 11,4 pN untersucht, sowie eine Probe der TATA-Box ohne DNA-Origami. Die Proben mit 0 pN, 2,5 pN und 6,2 pN wurden zusätzlich auch ohne zugesetztes TBP untersucht, um sicher zu stellen, dass der zweite FRET-Wert nur durch das Knicken der DNA durch das TBP verursacht wird. Die Messzeit lag für alle Proben zwischen 20 Minuten und einer Stunde.



Zunächst wurde der Hintergrund aus einer Messung des Messpuffers ohne Probe bestimmt ( $Bkgr_{DD} = 60,5$  Hz,  $Bkgr_{DA} = 204$  Hz,  $Bkgr_{AD} = 6$  Hz,  $Bkgr_{AA} = 168$  Hz). Anschließend wurde aus einer um den Hintergrund korrigierten Probenmessung das Übersprechen und die direkte Anregung ermittelt, indem die Populationen für Donor und Akzeptor alleine („E=0“, „S=1“ und „S=0“) betrachtet wurden. Das Übersprechen lag bei 14% und die direkte Anregung bei 11%. Alle Messungen wurden um den Hintergrund, sowie das Übersprechen und die direkte Anregung korrigiert. Der ALEX-2CDE-Filter wurde auf <12 eingestellt, um Photobleichen und dergleichen aus den Messergebnissen zu entfernen.

Da es schwierig ist für eine globale Gamma-Korrektur die beiden Populationen voneinander zu trennen, wurde eine lokale Gamma-Korrektur durchgeführt. Dafür wurde die 0 pN Probe mit TBP verwendet, da bei dieser das Verhältnis zwischen den beiden FRET-Populationen am ausgewogensten ist. Die korrigierten S-Werte aller Bursts wurden gegen die korrigierten E-Werte aufgetragen (Abbildung A 17) und der folgende Fit angepasst um den Gamma- und den Beta-Wert zu bestimmen [68]:

$$S = \frac{1}{1 + \gamma \cdot \beta + (1 - \gamma) \cdot \beta \cdot E} \quad (54)$$

Der Gamma-Wert liegt bei 2,46 und der Beta-Wert bei 0,76.

In Abbildung 53 A-C sind die Histogramme über die gamma- und beta-korrigierten FRET-Effizienzen der Proben ohne (A) und mit TBP (B) dargestellt sowie die Probe mit TBP, die nicht in der Kraftklammer eingespannt war (C). Die Zahlen in jedem Graphen stellen die Anzahl an gemessenen Molekülen dar. Dadurch, dass bei Lösungsmessungen sich jedes Molekül nur für wenige Millisekunden im Detektionsvolumen befindet, können innerhalb kurzer Zeit (20 - 60 Minuten) mehrere Tausende Moleküle untersucht werden. Zunächst ist zu erkennen, dass solange der Lösung kein Protein zugegeben wurde (A) nur eine Population bei einer niedrigen FRET-Effizienz auftritt. Diese Population ist für die drei beispielhaft gewählten Kraftproben (0 pN, 4,1 pN, 6,2 pN) nahezu identisch und liegt bei  $0,19 \pm 0,07$ . Die Zugabe von TBP führt dazu, dass sich eine zweite Population mit einer höheren FRET-Effizienz von  $0,49 \pm 0,13$  ausbildet. Die Probe, die nicht in der DNA-Origami Kraftklammer eingespannt war (C) hatte leicht verschobene FRET-Effizienzen von  $0,22 \pm 0,07$  und  $0,54 \pm 0,13$ . Damit liegen die niedrigen FRET-Effizienzen nahe an dem berechneten von 0,14. Die etwas größere Abweichung für den geknickten Zustand zur berechneten FRET-Effizienz von 0,63 liegt vermutlich darin begründet, dass für die Berechnung des Abstands nur eine Näherung gemacht wurde. In Abbildung 53 D sind die berechneten und gemessenen FRET-Effizienzen noch einmal graphisch dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, dass bei der hohen FRET-Effizienz zwar eine größere Abweichung vorkommt, diese jedoch bezogen auf den Abstand vernachlässigbar klein ist.

Beim Vergleich der Proben in der Kraftklammer und ohne diese fällt auf, dass sich das Verhältnis der Populationen ändert. Dies deutet darauf hin, dass das TBP eine niedrigere Affinität hat, an die TATA-Box zu binden, wenn diese in dem DNA-Origami verankert ist. Dies könnte darin begründet liegen, dass die TATA-Box schwerer zugänglich ist, wenn sie von einem großen Körper (der DNA-Origami-Kraftklammer) umgeben ist. Nichtsdestoweniger ist ein klarer Trend erkennbar, wenn die Kräfte sukzessive erhöht werden. Je höher die Kraft wird, desto schwieriger ist es für das TBP, an die TATA-Box zu binden und diese zu knicken, bis bei etwa 11,4 pN nahezu kein TBP mehr an die TATA-Box anbinden kann.

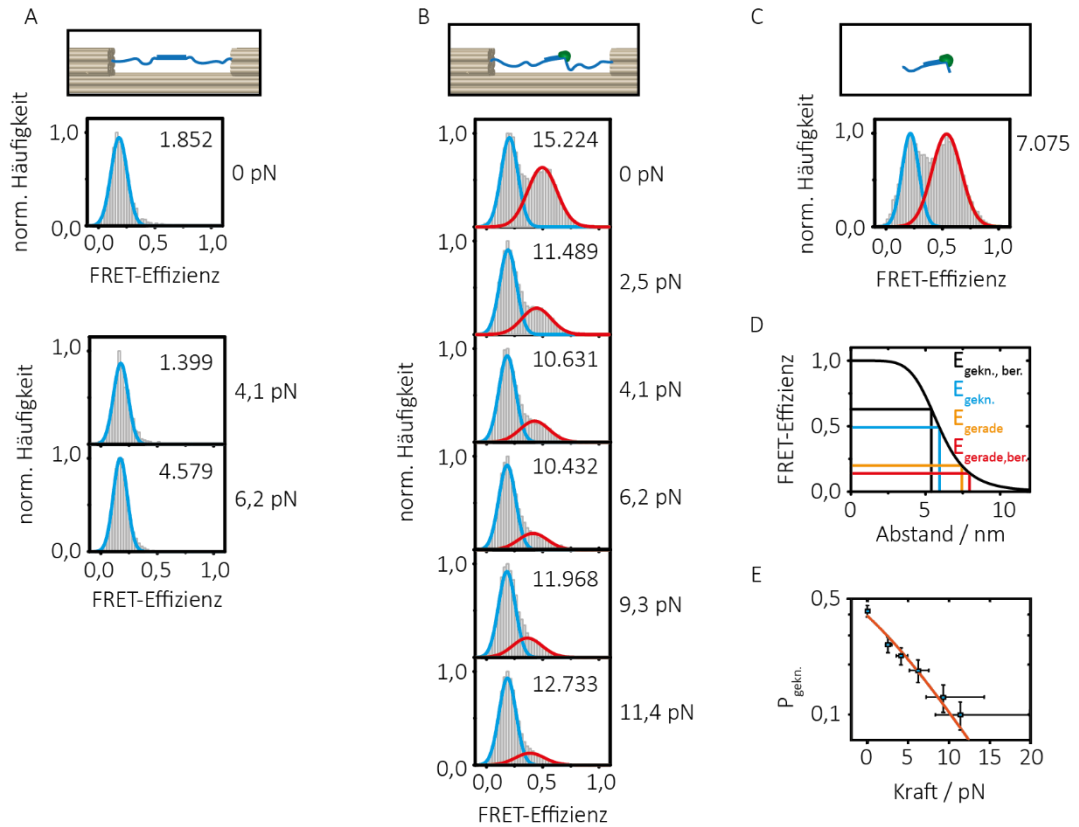


Abbildung 53: Darstellung der gamma- und beta-korrigierten Histogramme über die FRET-Effizienz für die Probe in der DNA-Origami Kraftklammer ohne (A) und mit (B) TBP und außerhalb der DNA-Origami Kraftklammer mit TBP (C). D) Auftragung der FRET-Effizienz gegen den Abstand für Atto532/Atto647N. Eingetragen wurden die berechneten FRET-Effizienzen für die Zustände geknickt (schwarz) und gerade (rot) sowie die gemessenen FRET-Effizienzen für geknickt (blau) und gerade (gelb). E) Semi-logarithmische Auftragung der Wahrscheinlichkeit des geknickten Zustands  $P_{\text{gekn.}}$  gegen die angelegte Kraft  $F$ . Der Fit entspricht der Boltzmann-Verteilung (55). Die Fehler sind Standardfehler.

Die Wahrscheinlichkeit, dass TBP an die DNA binden kann ist in Abhängigkeit von der anliegenden Kraft in Abbildung 53 E dargestellt. Dazu wurden die Flächen unter den Kurven aus (B) ins Verhältnis gesetzt:  $P_{\text{gekn.}} = A_{\text{gekn.}} / (A_{\text{gekn.}} + A_{\text{gerade}})$ . Der Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit des Knickens und der Kraft kann durch eine Boltzmann-Verteilung dargestellt werden.

$$P_{\text{gekn.}} = \frac{\exp\left(\frac{\Delta G - F \cdot \Delta x}{k_B T}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G - F \cdot \Delta x}{k_B T}\right)} \quad (55)$$

$\Delta G$  ist die Änderung der freien Energie zwischen dem geraden und dem geknickten Zustand.  $F$  ist die durch die molekulare Kraftklammer wirkende Kraft,  $\Delta x$  ist die Änderung des Abstandes entlang einer eindimensionalen Reaktionskoordinate,  $k_B$  ist die Boltzmannkonstante und  $T$  die Temperatur.

Es ist zu erkennen, dass die Wahrscheinlichkeit von nahezu 50% ohne Kraft auf 10% mit 11,4 pN absinkt.

## 4.2. DNA-Origami Lichtsammelkomplex

In Zusammenarbeit mit der Gruppe um Ulrich Keyser aus Cambridge wurde der Antenneneffekt eines FRET-Paares bestehend aus einem Akzeptor und einer variablen Anzahl an Donoren auf einem rechteckigen DNA-Origami untersucht.

Der Antenneneffekt [80] beschreibt die gesamte Verstärkung der Emission des Akzeptormoleküls durch die Anwesenheit des Donormoleküls und ist wie folgt definiert:

$$AE = \frac{I_{FRET}}{I_{A,A}^{bkg}} \quad (56)$$

Die Intensität, die durch den Energieübertrag vom Donor auf den Akzeptor vom Akzeptor emittiert wird, muss zuvor um direkte Anregung und Übersprechen nach Formel (37) korrigiert werden. Alle verwendeten Werte sind entsprechend Formel (34) um den Hintergrund korrigiert.

Wichtig zu erwähnen ist hier, dass der Antenneneffekt von der Anregungswellenlänge abhängig ist. Für den Vergleich unterschiedlicher Proben miteinander ist dies allerdings nicht relevant, sofern für alle Messungen die gleichen Einstellungen verwendet werden.

Die effizienteste Version eines Lichtsammelkomplexes in einem zweidimensionalen Raum besteht aus einem Ring aus Donormolekülen um ein Akzeptormolekül, welcher zugleich auch die geringsten Abstände von 5,2 nm (senkrecht zur Helix) und 5,6 nm (diagonal zur Helix) zwischen dem Ring und dem Zentrum ermöglicht. Das von der Gruppe um Ulrich Keyser synthetisierte zweilagige DNA-Origami hat eine Größe von 170 Basenpaaren mal 24 Helices (Abbildung 54 A). Als Farbstoffmoleküle wurden Cy3 (Donor) und Cy5 (Akzeptor) verwendet, die einen Försterradius von 5,4 nm haben [81].

Die Gruppe um Ulrich Keyser synthetisierte 40 unterschiedliche Anordnungen der bis zu sechs Donormoleküle um das Akzeptormolekül (siehe Abbildung A 19) und untersuchte sie mit einem Fluoreszenzspektrometer. Für eine identische Anzahl an Donoren mit einem gleichen Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist zu erwarten, dass der gleiche Antenneneffekt erhalten wird. Dies gilt beispielsweise für die in Abbildung A 19 dargestellten Kombinationen der 1:1 Stöchiometrie (2/3/5/6, sowie 1/4). In Abbildung A 19 sind solche übereinstimmenden Einheiten farblich dargestellt. Somit bietet sich die Möglichkeit, Proben mit gleicher Zusammensetzung zu mitteln, um mögliche lokale Unterschiede auszugleichen. In Abbildung A 20 A ist die lineare Abhängigkeit des Antenneneffekts von der Anzahl an Donoren dargestellt. Da bekannt ist, dass Magnesiumionen einen großen Einfluss auf den Abstand zwischen zwei Helices haben, wurde die Abhängigkeit des Antenneneffekts von der Magnesiumchlorid-Konzentration überprüft (siehe Abbildung A 20 B). Dabei ist zu sehen, dass mit steigender Konzentration an Magnesium-Ionen, der Antenneneffekt verstärkt wurde, was wiederum auf eine Verringerung des Donor-Akzeptor-Abstandes hindeutet. Daher wurde für alle Messungen ein fester Anteil an Magnesiumchlorid von unter 20 mM verwendet (11 mM für die Spektrometer-Messungen und 12,5 mM für die Einzelmolekülmessungen). Des Weiteren wurde von der Arbeitsgruppe um Ulrich Keyser überprüft, ob der starke Antenneneffekt bei der ringförmigen Struktur tatsächlich durch den Übertrag von sechs Donoren auf einen Akzeptor geschieht, indem sie eine Probe hergestellt und gemessen haben bei der sich der Akzeptor außerhalb des Ringes befindet (siehe Abbildung A 20 C). Der Vergleich mit dem eigentlichen Ringsystem zeigt, dass der Akzeptor außerhalb des Ringes deutlich weniger Photonen aussendet als der innerhalb

des Ringes. Dies bestätigt die Annahme, dass die Verstärkung des Antenneneffekts bei der Ringstruktur mit einem Akzeptor in der Mitte durch den Übertrag der Energie von jedem einzelnen Donor auf den Akzeptor ausgelöst wird.

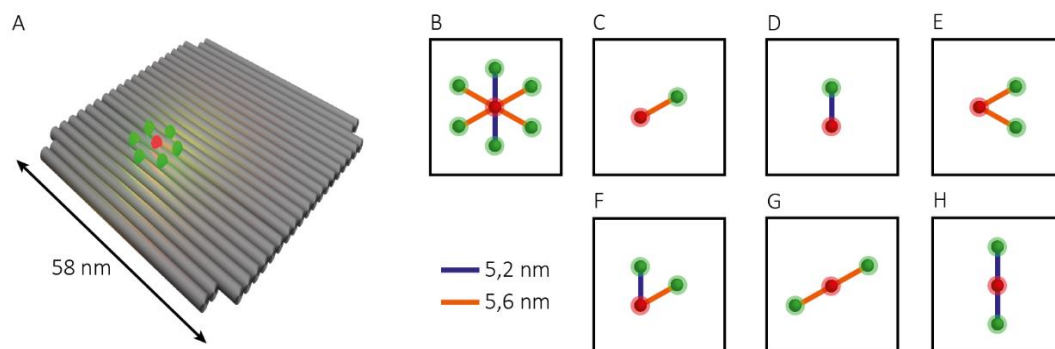


Abbildung 54: A) Rechteckiges DNA-Origami mit sechs ringförmig angeordneten Donormolekülen (Cy3) um einen Akzeptormolekül (Cy5). B) Synthetischer Lichtsammelkomplex aus sechs Donormolekülen. C und D) Proben mit einem Donor und einem kurzen (D) und einem langen Abstand (C). E-H) Proben mit zwei Donormolekülen in unterschiedlichen Geometrien. Die blaue Verbindungslinie zwischen den Molekülen bezeichnet den kürzeren Abstand (5,2 nm) und die orangene Verbindungslinie den längeren Abstand (5,6 nm).

Um die aus den Ensemble-Messungen erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und auch die Homogenität der Proben zu untersuchen, wurden Einzelmolekül-FRET-Messungen durchgeführt. Dafür wurde das in Kapitel 3.2.2 beschriebene Fluoreszenzmikroskop sowie mit BSA passivierte LabTek-Oberflächen verwendet, um Lösungsmessungen durchzuführen. Die DNA-Origami wurden jeweils in einem photostabilisierenden Puffer (siehe Kapitel 3.3.5) mit zusätzlich 12,5 mM Magnesiumchlorid so stark verdünnt, dass nur einzelne Moleküle durch den Anregungsfokus schwimmen ( $\sim 0,1$  nM). Die Leistung des grünen Lasers (532 nm) lag bei 72  $\mu$ W und die des roten Lasers (640 nm) bei 60  $\mu$ W. Alle im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden um den Hintergrund sowie um die direkte Anregung und das Übersprechen korrigiert. Da die Laserleistung von Messung zu Messung konstant gehalten wurde, blieb die direkte Anregung für alle Proben gleich ( $\sim 0,9\%$ ). Für das Übersprechen hingegen wurde für jede Messung ein eigener Wert ermittelt, da dieser Wert stark von der Anzahl der Donoren abhängig ist ( $\sim 0,12\%$ - $0,15\%$ ). Des Weiteren wurde eine Gamma-Korrektur durchgeführt ( $\gamma = 0,38$ ,  $\beta = 2,45$ ).

Für die Einzelmolekül-FRET-Messungen wurden sieben Proben ausgewählt (siehe Abbildung 54 B-H). Um die Abstände der Farbstoffmoleküle zueinander zu bestimmen, wurden die beiden Proben mit nur einem Donor ausgewählt und die FRET-Effizienz bestimmt. Theoretisch wäre ein Abstand von 5,2 nm und 6,0 nm zu erwarten gewesen, unter der Annahme, dass der Abstand zwischen zwei Basen bei 0,34 nm liegt und der durchschnittliche Helix-Helix-Abstand bei 2,6 nm [82, 83]. In Abbildung 55 sind die Ergebnisse der Messungen als Histogramme für die FRET-Effizienz und die Stöchiometrie dargestellt. Für die beiden Proben mit einem Donor ergibt sich so die erwartete Stöchiometrie von  $\sim 0,5$ , welche einer 1:1-Verteilung entspricht und eine FRET-Effizienz von 0,44 für den langen Abstand und eine FRET-Effizienz von 0,58 für den kurzen Abstand. Durch Einsetzen dieser Werte in Gleichung (6) ergibt sich somit ein Abstand von 5,6 nm bzw. 5,2 nm.

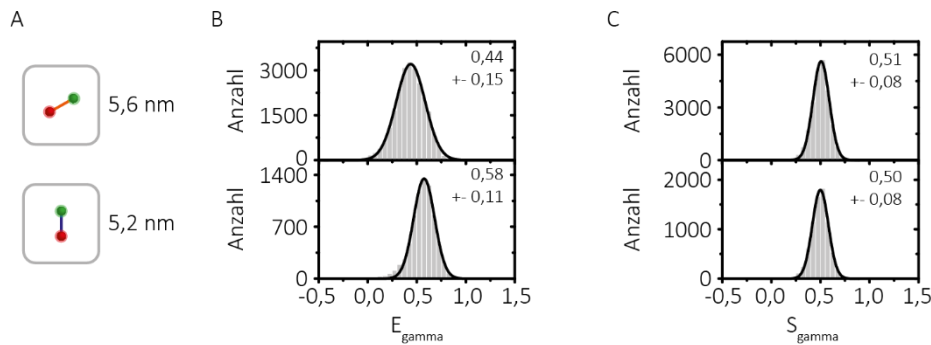


Abbildung 55: A) Skizzen der beiden gemessenen Konfigurationen der Donormoleküle zum Akzeptormolekül auf dem DNA-Origami. B) Gemessene FRET-Effizienzen der Proben aus (A). C) Gemessene Stöchiometrie der Proben aus (A). B) und C) sind gamma-korrigierte Werte.

Ferner wurde überprüft, ob eine Wechselwirkung der Donoren bei räumlicher Nähe einen Einfluss auf den Antenneneffekt hat. Dies wurde durch den Vergleich der Proben mit gleichem Abstand benachbarter Donoren (Abbildung 54 E, 5,2 nm) mit der Probe mit sich gegenüberliegenden Donoren (Abbildung 54 G, 10,4 nm) ermittelt. Der Förster-Radius für den Homo-FRET von Cy3 zu Cy3 beträgt 4,5 nm. Dies bedeutet, dass ein Donor-Donor-Energietransfer für einen Abstand von 5,2 nm durchaus wahrscheinlich ist, wohingegen bei einem Abstand von 10,4 nm der Energieübertrag von einem auf den anderen Donor vernachlässigbar gering ist. Während die Stöchiometrie-Werte für beide Proben nahezu identisch sind ( $0,62 \pm 0,07$  und  $0,64 \pm 0,07$ ) unterscheiden sich die FRET-Effizienzen ( $0,40 \pm 0,13$  und  $0,46 \pm 0,11$ ) und die Antenneneffekte ( $0,25 \pm 0,12$  und  $0,31 \pm 0,13$ ) deutlicher (siehe Abbildung A 21). Dies deutet darauf hin, dass bei der Probe mit dem geringeren Abstand zwischen den Donormolekülen Homo-FRET stattfindet und so die Effizienz des Energieübertrags vom Donor auf den Akzeptor etwas verringert wird. Insgesamt ist der Effekt des Homo-FRET jedoch so gering, dass er vernachlässigt werden kann.

Zusätzlich zu den beiden genannten Kombinationen an zwei Donoren mit einem Akzeptor, gibt es zwei weitere mögliche Konfigurationen. Bei diesen ist der Abstand zwischen den beiden Donor-Farbstoffmolekülen 11,2 nm (Abbildung 54 H) und 5,6 nm (Abbildung 54 F) und der Abstand zum Akzeptor 5,6 nm und 5,4 nm. In Abbildung 56 sind alle gemessenen Proben zusammengefasst dargestellt. In orange sind alle Proben mit zwei Donormolekülen. Hier ist zu sehen, dass die Stöchiometrie-Werte wie erwartet für alle Proben in etwa den gleichen Wert ergeben, wohingegen der Antenneneffekt und die FRET-Effizienz mit geringer werdendem Abstand zwischen Donoren und Akzeptor steigen.

Zu guter Letzt wurde das Ziel der Arbeit, die Antenne mit sechs Donormolekülen, untersucht. Diese zeigt eine weitere Verstärkung des Antenneneffekts auf einen Wert von  $0,82 \pm 0,25$  (siehe Abbildung 56 C). Dies entspricht etwa einer fünffachen Verstärkung im Vergleich zur Antenne mit nur einem Donormolekül.

Die Histogramme in Abbildung A 21 C zeigen anhand ihrer Form und Halbwertsbreite, dass die Proben sehr homogen sind. Besonders der Stöchiometrie-Wert zeigt eine schmale Verteilung. Die Halbwertsbreite der Histogramme kommt hauptsächlich durch Schrotrauschen zustande.

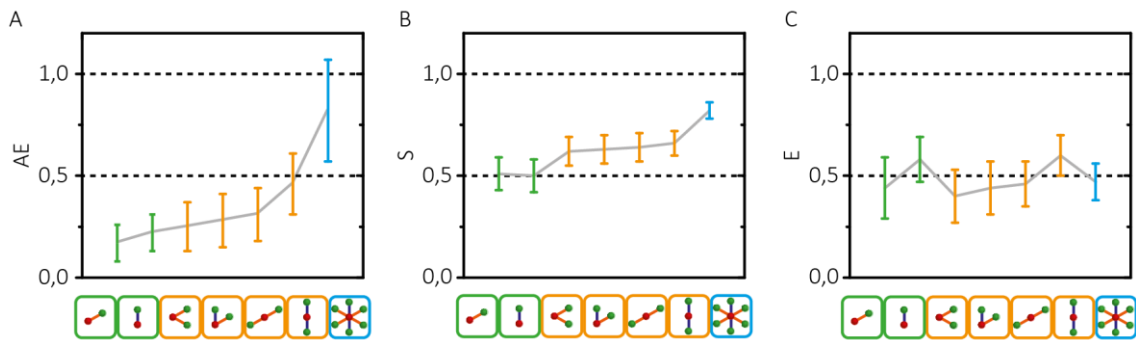


Abbildung 56: Aus den Histogrammen in Abbildung 55 erhaltene Erwartungswerte inklusive Standardabweichung für den A) Antenneneffekt, B) die Stöchiometrie und C) die FRET-Effizienz für die entsprechende Probe. In grün sind die Proben mit einem Donor, in orange die Proben mit zwei Donoren und in blau die Probe mit sechs Donoren dargestellt.

In Abbildung 57 ist ein Vergleich der Einzelmolekül-FRET-Messungen mit den Ensemble-Messungen im Fluoreszenzspektrometer dargestellt. Insgesamt ist ein ähnlicher Trend zu sehen, wobei die Unterschiede in den Kombinationen mit zwei Donoren und einem Akzeptor in den Ensemble-Messungen nicht aufgelöst werden konnten. Der Unterschied der Absolutwerte kommt durch die unterschiedlichen Anregungswellenlängen von Einzelmolekül- und Ensemble-Messung zustande. Weitere Informationen zum Einfluss der Laserleistung auf den Antenneneffekt können den SIs der entsprechenden Veröffentlichung entnommen werden [17]. Dies zeigt, dass es aufgrund der sehr reinen Proben möglich ist, mit DNA-Origami Lichtsammelkomplexe zu modellieren und im Fluoreszenzspektrometer zu messen. Dies erhöht den Durchsatz an Messungen, die getätigt werden können. Zudem haben viele Labore Fluoreszenzspektrometer und müssen sich kein deutlich teureres und komplexeres Einzelmolekülmikroskop anschaffen.

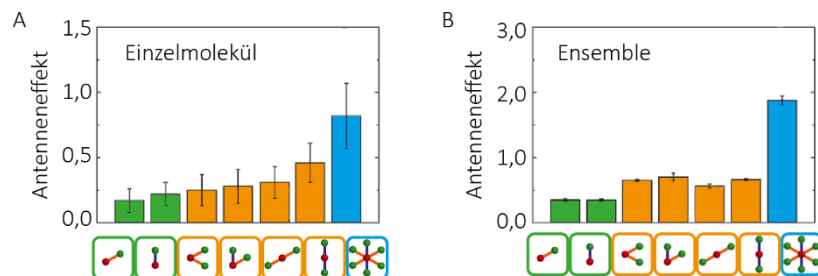


Abbildung 57: Ergebnisse der Messungen der ausgewählten sieben Proben mit der A) Einzelmolekül-FRET-Mikroskopie und der B) Messung mit dem Fluoreszenzspektrometer, verändert nach [17].

Abschließend konnte mit den Einzelmolekül-FRET-Messungen gezeigt werden, dass die Proben das erwartete Verhalten zeigen und sehr homogen und stabil sind.

### 4.3. Kombinierte Dunkelfeld-Fluoreszenz-Messungen

Wie bereits in den vorigen Kapiteln besprochen wurde, sind mNP bei Beleuchtung mit elektromagnetischer Strahlung in der Lage ein elektrisches Feld auszubilden. Dieses wiederum führt zu einer erhöhten Anregungs- und Emissionsrate der Farbstoffmoleküle, die sich in unmittelbarer Umgebung befinden. Dieser Effekt wird genutzt, indem DNA-Origami basierte Nanoantennen entwickelt werden, die aus zwei mNP bestehen, in deren Mitte (dem „Hotspot“) sich ein Farbstoff befindet. Um diese Nanoantennen zu charakterisieren wurde im Rahmen dieser Arbeit ein konfokales Fluoreszenzmikroskop um eine hyperspektrale Dunkelfeld-Einheit erweitert. Zunächst musste ein Verfahren entwickelt werden, um das Mikroskop auf Funktionalität zu überprüfen. Dies wird im folgenden Kapitel besprochen.

Bei allen folgenden Ergebnissen wurden die Dunkelfeldspektren entsprechend Kapitel 3.2.3 um den Hintergrund und das Lampenspektrum korrigiert, sowie auch eine Entfaltung der Fluoreszenzlebensdauer mit FluoFit (PicoQuant) entsprechend Kapitel 3.2.1 durchgeführt.

#### 4.3.1. Überprüfung des Dunkelfeld-Mikroskops

Zur Überprüfung des eingebauten Dunkelfeldmikroskops wurden zunächst die Streuspektren von Gold-NP unterschiedlicher Größen aufgenommen. Zu diesem Zweck wurden die Gold-NP (BBI Solutions) jeweils in einen 1xPBS-Puffer mit 12 mM Magnesiumchlorid überführt und elektrostatisch in einer Flusskammer immobilisiert. Die verwendeten Integrationszeiten waren 1 s, 600 ms, 400 ms und 200 ms für die 20 nm, 40 nm, 60 nm und 80 nm großen Gold-NP. In die Auswertung wurden nur solche Spektren aufgenommen, deren maximale Streuwellenlänge nicht mehr als 5% von der mittleren Streuwellenlänge abwich. Dies liegt darin begründet, dass die von BBI Solutions verwendeten Gold-NP nicht alle die gleiche Größe bzw. Form haben und es die Möglichkeit der Aggregation der mNP gibt. So kann es bei den Aufnahmen der Spektren zu Verschiebungen der Streuwellenlänge kommen. Die ausgewählten Spektren wurden wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, ausgewertet, gemittelt und mit den von Dr. Guillermo Acuna erstellten Simulationen der Spektren in einem Graphen dargestellt (Abbildung 58 A). Hier wird ersichtlich, dass für die Gold-NP (40 nm/60 nm/80 nm) nur geringe Abweichungen zu verzeichnen sind, während bei 20 nm großen Gold-NP die Auflösungsgrenze erreicht ist. Dies zeigt sich auch in den benötigten relativ langen Integrationszeiten für kleine Gold-NP. Die ermittelten Streuwellenlängen wurden in die Resonanzenergie  $E_{res}$  umgerechnet und anschließend gegen die Partikelgröße  $d$  aufgetragen und mit einer Funktion angepasst. Die Funktion (57) wurde der Doktorarbeit von Carsten Sönnichsen [43] entnommen, der diese aus Berechnungen mit der Mie-Theorie aufgestellt hat, und den gemessenen Daten entsprechend angepasst (58).

$$d[\text{nm}] = 215[\text{nm}/\text{eV}^{0.5}] \sqrt{2,26[\text{eV}] - E_{res}[\text{eV}]} \quad (57)$$

$$d_{exp}[\text{nm}] = 200[\text{nm}/\text{eV}^{0.5}] \sqrt{2,36[\text{eV}] - E_{res}[\text{eV}]} \quad (58)$$

Durch Umformen der Gleichung (58) und Umwandeln der Energie in die Wellenlänge ergibt sich folgende Fit-Funktion:

$$\lambda[\text{nm}] = 1242 [\text{eV} \cdot \text{nm}] / (2,36[\text{eV}] - 2,5 \cdot 10^{-5} [\text{eV}/\text{nm}^2] \cdot d^2 [\text{nm}^2]) \quad (59)$$

Da die Streuspektren von Gold-NP stark umgebungsabhängig sind, wurden des weiteren Streuspektren von DNA funktionalisierten Gold-NP aufgenommen. Diese sind in Abbildung 58 C und D zu sehen. Die verwendete DNA hat eine Länge von

15 Basenpaaren und führt durch eine Veränderung des Brechungsindex zu einer Rot-Verschiebung des Streuspektrums um etwa 5 nm (40 nm: 536 nm zu 541 nm; 80 nm: 559 nm zu 565 nm).

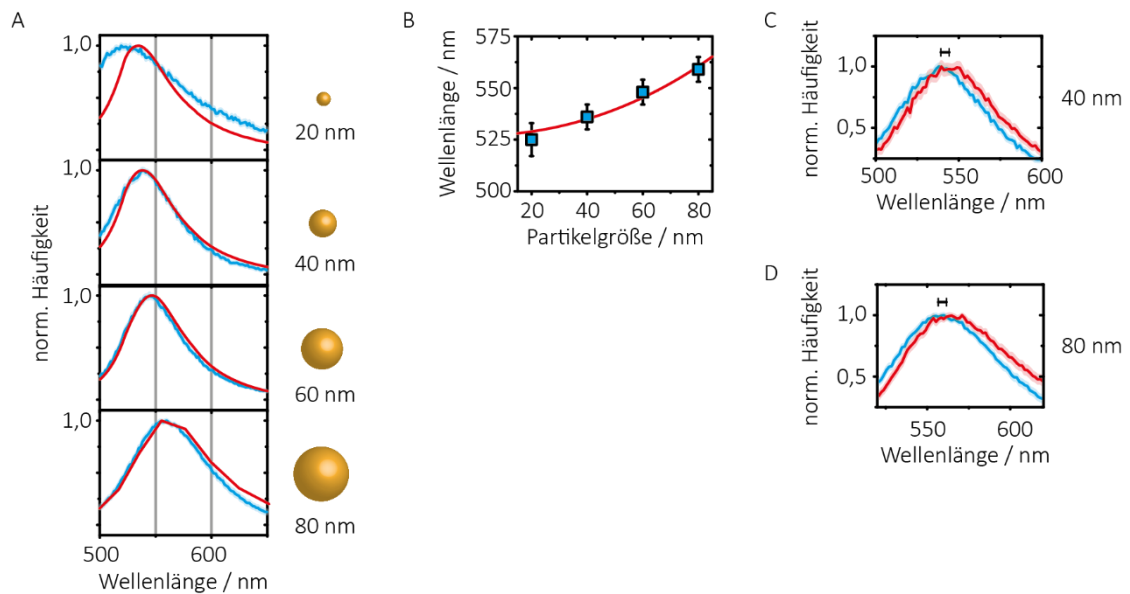


Abbildung 58: A) Streuspektren von Gold-NP zunehmender Größe. Blau: aus Messung mehrerer (>30) Gold-NP gemitteltes Streuspektrum, rot: Simulation. B) Auftragung der aus (A) ermittelten Peak-Position der Streuwellenlänge mit Standardfehler gegen die Partikelgröße und der entsprechenden Kurvenanpassung gemäß Gleichung (59). C) über mehrere Moleküle (>30) gemitteltes Streuspektrum für 40 nm Gold-NP mit (rot) und ohne (blau) DNA. D) über mehrere Moleküle (>30) gemitteltes Streuspektrum für 80 nm Gold-NP mit (rot) und ohne (blau) DNA.

Befinden sich zwei mNP in unmittelbarer Nähe zueinander (<20 nm), koppeln diese und es entstehen zwei Dipole mit unterschiedlichen Plasmonenresonanzen (Abbildung 59 C). Die Plasmonenresonanz, die senkrecht zum Dipol wirkt, entspricht in etwa der Resonanzfrequenz des Monomers (Abbildung 59 B und D), während die Plasmonenresonanz längs zur Dipolebene eine Rot-Verschiebung aufweist (Abbildung 59 D). Durch diese Rot-Verschiebung ist es nun wiederum möglich, Monomere von Dimeren spektroskopisch zu unterscheiden. Zudem ist auch die Resonanz entlang des Dipols aufgrund der vergrößerten Weglänge viel stärker, und es kommt zu einer stärkeren Streuung als beim Monomer. Um dies experimentell zu zeigen, wurde ein Linearpolarisator in den Detektionsbereich eingeführt. Dieser konnte in Schritten von 30° manuell verstellt werden.

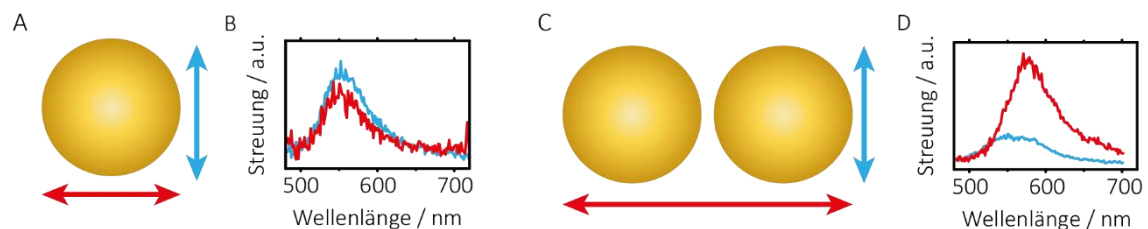


Abbildung 59: Darstellung der Polarisationsabhängigkeit der Partikel, A) Monomer und C) Dimer. Streuspektren für den Monomer (B) und den Dimer (D) zeigen Unterschiede bei paralleler Polarisation (rot) und senkrechter Polarisation (blau).



Zur Überprüfung der Polarisation werden Gold-Nanostäbchen (Nanopartz, siehe Abbildung 60 A) verwendet, die, ähnlich wie ein Dimer aus mNP, zwei Plasmonenresonanzen zeigen. Allerdings sind diese bei Nanostäbchen viel stärker voneinander getrennt, da der Bereich, über den die Resonanz auftritt, in der longitudinalen Mode (80 nm) viel größer ist als bei der transversalen Mode (40 nm, siehe Abbildung 60 B). Mit einem UV/Vis-Spektrometer (NanoDrop2000, Thermo Scientific) wurde zunächst das Extinktionsspektrum aller Nanostäbchen in einem Puffer aus 1xPBS und 12 mM Magnesiumchlorid aufgenommen (siehe Abbildung 60 C). Bei diesem sind bereits die zwei Moden zu erkennen (530 nm/662 nm). Anschließend wurden die Nanostäbchen, wie auch die Gold-NP zuvor, elektrostatisch in einer Flusskammer an das Glas angebunden und untersucht (200 ms Integrationszeit). Die erhaltenen Streuspektren wurden wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben korrigiert und eine Auswahl in Abbildung 60 D dargestellt. Auch hier sind deutlich die beiden Plasmonenresonanzen zu sehen (550 nm / 670-690 nm). Des Weiteren ist hier auch die Abhängigkeit des Streuspektrums von der Einstellung des Linearpolarisators dargestellt. Von Blau nach Rot ändert sich der Winkel in 30°-Schritten.

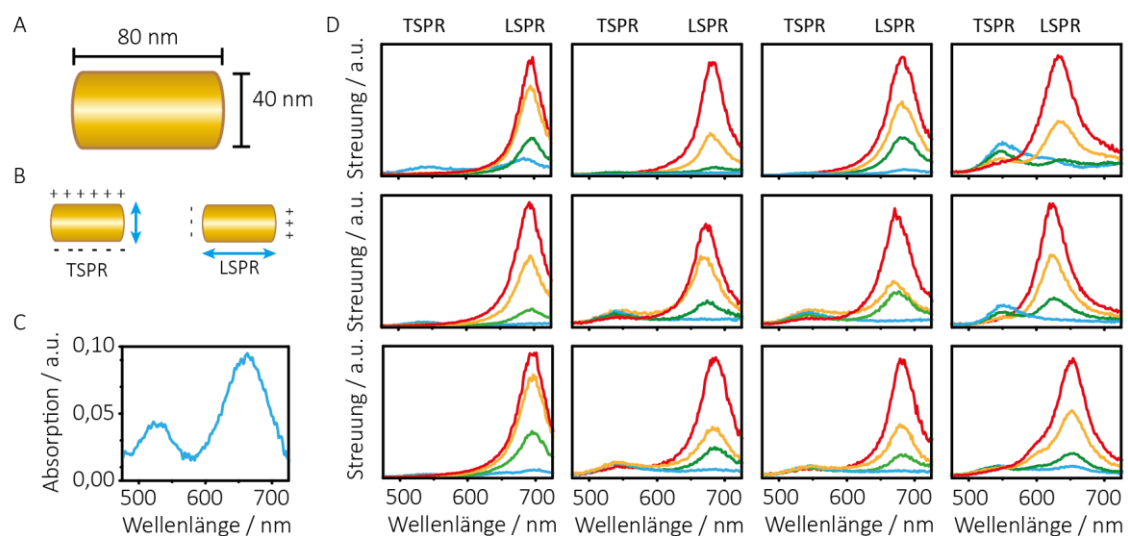


Abbildung 60: A) Schematische Darstellung eines Nanostäbchens. Die von Nanopartz für die Messung verwendeten Gold-Nanostäbchen haben eine Länge von 80 nm und einen Durchmesser von 40 nm. B) Darstellung der zwei möglichen Plasmonenresonanzen in longitudinaler Richtung (LSPR) und transversaler Orientierung (TSPR). C) Extinktionsspektrum der Gold-Nanostäbchen. D) Streuspektren einzelner Nanostäbchen. Von blau nach rot wird die Polarisation in 30°-Schritten geändert.

#### 4.3.2. Die DNA-Origami Nanoantenne

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit selbst-assemblierenden Nanoantennen und deren spektroskopischen Eigenschaften. Zum einfacheren Verständnis werden im Folgenden alle untersuchten DNA-Origamis als Nanoantennen bezeichnet, unabhängig davon, ob sie ein, zwei oder gar kein mNP tragen. Eine Nanoantenne mit einem mNP wird Monomer genannt, wohingegen eine Nanoantenne mit zwei Partikeln als Dimer bezeichnet wird. Für die Untersuchung der Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen (in dieser Arbeit Atto647N) mit mNP unterschiedlicher Größen wurde ein turmförmiges DNA-Origami (TO) verwendet (siehe Abbildung 61 A), das eine Gesamthöhe von 150 nm hat und aufgrund seiner Form das Anbringen von mNP bis zu einem Durchmesser von etwa 200 nm ermöglicht. In dieser Arbeit wurden mNP mit einem Durchmesser von 40 nm bis 100 nm verwendet. Das Hauptgerüst des TO besteht aus einem Bündel von zwölf Helices, die eine Höhe von 96 nm und einen Durchmesser von 15 nm haben. An der Basis sind acht Biotin-Moleküle angebracht, über die das TO an eine BSA-Biotin-Neutraavidin-Oberfläche an Glas gebunden werden kann. Die Basis ist so breit gewählt, damit das DNA-

Origami gerade auf der Oberfläche stehen kann. Der obere Teil des TO (29 nm) besteht aus sechs gebündelten Helices (6HB) mit einem Durchmesser von 6 nm an denen drei oder sechs DNA-Stränge mit einer Verlängerung um 30 Basen ( $A_{30}$ ) eingebaut werden, die aus dem DNA-Origami herauschauen und die Möglichkeit bieten, ein oder zwei mNP anzubinden. Es werden jeweils drei Stränge für die Anbindung eines mNP verwendet, um die Wahrscheinlichkeit der Hybridisierung zu erhöhen und die Bindung zu stabilisieren. Dabei gibt es zwei mögliche Konfigurationen, in denen die mNP anbinden können, je nachdem welcher Art die DNA-Funktionalisierung der mNP ist. Die mNP sind mit DNA ( $T_{25}$ ) über eine kovalente Thiol-Gold-Bindung funktionalisiert, sodass sie an die DNA ( $A_{30}$ ) des DNA-Origamis hybridisieren können. In der (S)-Konfiguration (S = „Schere“) wurde die DNA über das 5'-Ende an das mNP gebunden und in der (R)-Konfiguration (R = „Reißverschluss“) über das 3'-Ende (siehe Abbildung 61 B, C). Das Farbstoffmolekül (in dieser Arbeit Atto647N) wird innerhalb des DNA-Origamis eingebaut in der Ebene der Anbinde-Stränge. In der (R)-Konfiguration sind die mNP näher an dem TO, und das Farbstoffmolekül erfährt durch den verringerten Abstand zum mNP eine größere Verstärkung als in der (S)-Konfiguration. In dieser Arbeit wird, wenn nicht anders angegeben, die (R)-Konfiguration verwendet, da bei dieser eine höhere Fluoreszenzverstärkung und eine stärkere Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer und der Streuspektren der mNP zu erwarten ist. Vietz et al. [74] zeigten, dass der Abstand zwischen Farbstoff und mNP bei einer DNA-Länge von 25 Basenpaaren 6 nm in der (R)-Konfiguration und 6,5 nm in der (S)-Konfiguration beträgt.

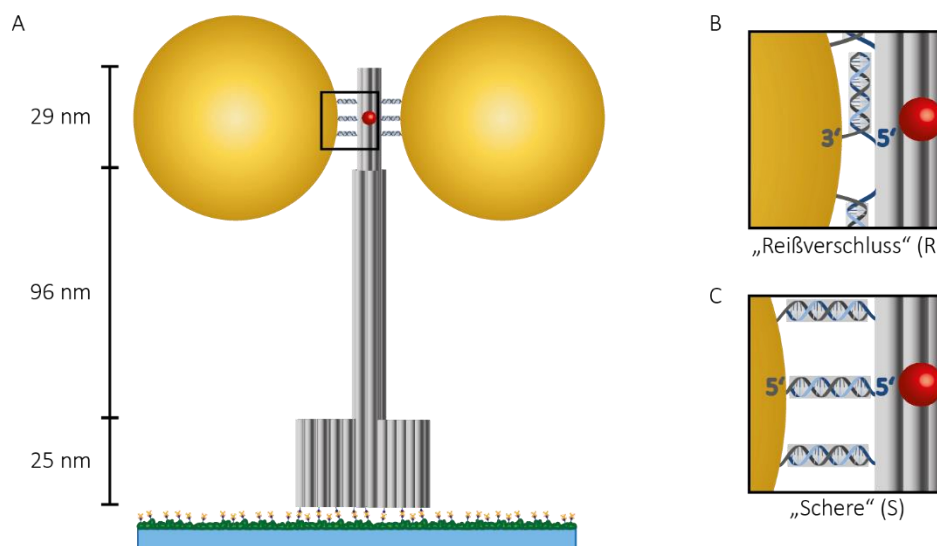


Abbildung 61: A) Schematische Darstellung der verwendeten Nanoantenne, die über ihre Biotin-Moleküle an eine BSA-Biotin-Neutraavidin-Oberfläche auf Glas gebunden ist. An dem oberen aus sechs Helices bestehenden Teil sind zwei 60 nm große Gold-NP angebunden. Die beiden möglichen Anbinde-Konfigurationen des „Reißverschlusses“ (R) und der „Schere“ (S) sind in B) und C) dargestellt.

Als Farbstoff wurde Atto647N verwendet, da dieser eine relativ hohe Quantenausbeute von 65% und eine lange Fluoreszenzlebensdauer von 3,5 ns hat [84]. Die lange Lebensdauer ist wichtig, da das Farbstoffmolekül in der Nähe der mNP eine starke Verringerung dieser erfährt und nur so eine Unterscheidung zwischen Farbstoff in Anwesenheit und Abwesenheit von mNP gemessen werden kann. Bei einem Farbstoff, der bereits eine sehr kurze Fluoreszenzlebensdauer hat, würde die Anwesenheit der mNP zu einer Verringerung führen, die durch die begrenzte Zeitauflösung des verwendeten Mikroskops kaum mehr messbar wäre. Weiterhin sind die Absorption und Emission von Atto647N im Vergleich zu den Streuspektren der mNP Rot-verschoben (siehe Abbildung 62). Dies führt, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, zu einer optimalen Wechselwir-

kung zwischen dem mNP und dem Farbstoff. Des Weiteren zeigt Atto647N eine moderate Photostabilität und Photoblinken in PBS-Puffer ohne weitere Stabilisatoren. Dadurch ist es möglich, die Fluoreszenz eines Moleküls über mehrere Sekunden aufzunehmen und gleichzeitig aber auch zu erkennen, dass es einzelne Moleküle sind, wenn die kurzen Auszustände auftreten.

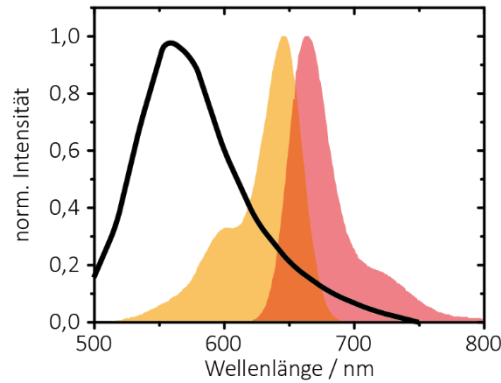


Abbildung 62: Von Guillermo Acuna mit der kommerziellen Software CST (FDTD-Simulationen) erstelltes Streuspektrum von 80 nm Gold-NP (schwarz). Absorptionsspektrum (orange) und Emissionsspektrum (rot) von Atto647N [84].

#### 4.3.2.1. Das Monomer

Zunächst sollte die Wechselwirkung zwischen einem mNP und dem Farbstoff untersucht werden. Die Nanoantennen-Proben wurden wie in Kapitel 3.3.1 und 3.3.3 beschrieben hergestellt. Damit die Flusskammer während der Messung nicht austrocknet, wurde sie mit Klebstoff verschlossen und anschließend auf dem Mikroskoptisch fixiert.

Für alle Proben wurde bei den Fluoreszenzmessungen eine Anregungsleistung von 0,5  $\mu$ W (640 nm, 78 MHz) verwendet, um zum einen die Moleküle nicht so stark zum Fluoreszieren zu bringen, dass die APD in Sättigung geht und zum anderen ein Aufheizen der mNP zu verhindern. Als Puffer wurde jeweils 1xPBS mit 12 mM Magnesiumchlorid und 100 mM Natriumchlorid verwendet. Dieser sorgt für eine ausreichende Stabilität des DNA-Origamis und der mNP-Bindung, sowie für ein Photoblinken der Farbstoffmoleküle. Durch das Photoblinken der Farbstoffmoleküle kann sehr schnell sortiert werden, ob es sich um einzelne Moleküle handelt. Die Frequenz des EOM lag bei 10 Hz und die Geschwindigkeit der konfokalen Aufnahme bei 2 ms/Pixel (1 Pixel = 50x50 nm<sup>2</sup>). Die Aufnahmegeschwindigkeit der Dunkelfeldbilder lag jeweils bei 100 ms (100 nm Gold), 200 ms (80 nm Gold und Silber), 400 ms (60 nm Gold und Silber) und 600 ms (40 nm Gold) pro Zeile (512 Pixel). Jede Oberfläche wurde viermal gescannt und bei jeder dieser Aufnahmen der Linearpolarisator vor dem Spektrometer um 30° weitergedreht.

Da zunächst nur Monomere untersucht werden sollten, wurden an dem DNA-Origami nur drei Anbinde-Stränge auf einer Seite angebracht, an die die mNP anbinden konnten. In die Auswertung wurden nur die Moleküle aufgenommen, bei denen sowohl in der Dunkelfeldmessung, als auch in der Fluoreszenzmessung ein Molekül detektiert werden konnte. Des Weiteren wurde anhand des Photoblinsens und -bleichens des Farbstoffmoleküls sortiert, ob es sich um ein einzelnes Molekül oder mehrere Moleküle handelte. Da die von BBI Solutions erworbenen mNP relativ heterogen in ihrer Größe und Form sind (siehe Kapitel 4.3.2.3), mussten anhand der Dunkelfeldspektren gute sphärische mNP von mNP anderer Größe und Form als der zu erwartenden getrennt werden. Wie dies umgesetzt wurde, wird im Folgenden erläutert.

Für eine Kugel ist grundsätzlich zu erwarten, dass sie bei der Streuung des einstrahlenden Lichts dessen Polarisation nicht verändert. Da bei den Messungen unpolarisiertes Licht verwendet wurde, wird von den mNP auch unpolarisiertes Licht gestreut. Daher ist es nicht relevant, welche Einstellung an dem Linearpolarisator vor dem Spektrometer vorgenommen wird. Dementsprechend ist das erste Auswahlkriterium für den Monomer, dass die Spektren für jedes Molekül bei unterschiedlichen Polarisationen eine möglichst geringe Divergenz in ihren Streuwellenlängen zeigen ( $d\lambda_{\text{res}} < 10 \text{ nm}$ ). Nach dieser Vorsortierung wird ein Histogramm über die Streuwellenlänge der übrigen mNP erstellt, um die mittlere Streuwellenlänge zu erhalten. In Abbildung 63 sind die Histogramme für die Monomer-Nanoantenne mit 80 nm Silber-NP und 60 nm, 80 nm und 100 nm Gold-NP dargestellt.

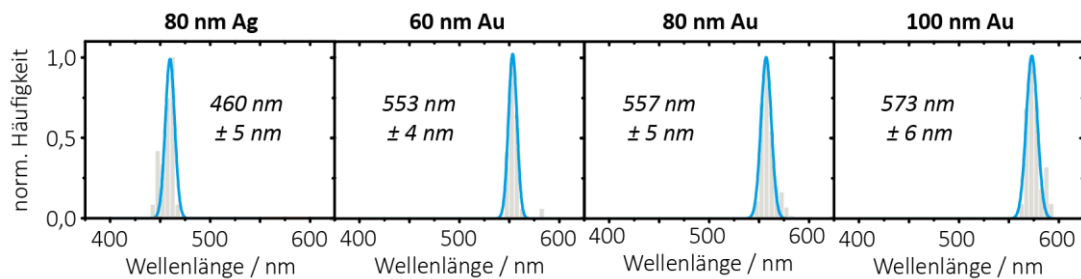


Abbildung 63: Histogramme über die nach Korrekturen experimentell bestimmte Streuwellenlänge mit Gauß-Fit und Standardabweichung von 80 nm Silber-NP, 60 nm Gold-NP, 80 nm Gold-NP und 100 nm Gold-NP an der Nanoantenne.

Die Differenz der Streuwellenlänge jedes Moleküls von der mittleren Wellenlänge ( $\lambda_{\text{mitt}}$ ) sollte danach weniger als 5% betragen. Moleküle mit größerer Abweichung werden als zu große bzw. zu kleine mNP oder als mNP mit nicht-sphärischer Form definiert und aussortiert. Zusätzlich zu der gleichbleibenden Wellenlänge bei einer Kugel ist auch eine gleichbleibende Amplitude ( $A_{\text{scat}}$ ) bei unterschiedlichen Polarisationen zu erwarten. Moleküle, die außerhalb der Varianz liegen, werden aussortiert.

In Abbildung 64 ist eine Messung der Nanoantenne (NA) mit 60 nm großen Gold-NP dargestellt. Die Fluoreszenzmessungen (A) und die Dunkelfeldmessungen (B) wurden miteinander verglichen und drei Moleküle beispielhaft ausgesucht. Bei Nanoantenne 2 und 3 ist sowohl ein Farbstoff vorhanden als auch ein einzelnes Gold-NP. Nanoantenne 1 hingegen enthält nur einen Farbstoff, ohne Gold-NP. TOs, an denen keine Gold-NP gebunden haben, können als interne Referenz für die Intensität eines Farbstoffmoleküls verwendet werden. Aus den Fluoreszenzmessungen wird für jeden Farbstoff die entsprechende Fluoreszenz-Zeit-Kurve ermittelt und in Abbildung 64 C für die ausgewählten Moleküle dargestellt. Ein Farbstoff, der keine plasmonischen Effekte spürt (Nummer 1 rot), erfährt keine Fluoreszenzverstärkung und dessen Fluoreszenz oszilliert im Idealfall nicht. Dies liegt darin begründet, dass das Farbstoffmolekül frei rotiert, mit einer Geschwindigkeit, die schneller ist als die Rotation des Anregungslichts durch den EOM. Das bedeutet, dass das Farbstoffmolekül immer im gleichen Maße angeregt wird, egal wie das Anregungslicht polarisiert ist. Ein Farbstoff, der sich in der Nähe zu einem Gold-NP befindet, erfährt hingegen eine Fluoreszenzverstärkung (13x blau (Nr 3), 5x schwarz (Nr 2)) und dessen Fluoreszenz oszilliert in Phase mit der Rotation des linearpolarisierten Lichts. Dies kommt dadurch zustande, dass das Farbstoffmolekül durch das elektrische Feld des Monomers nur dann eine maximale Fluoreszenzverstärkung erfährt, wenn das Anregungslicht parallel zu dem System Farbstoff-mNP ausgerichtet ist. Die Fluoreszenzverstärkung wird durch Vergleich der Intensität des Moleküls mit der Referenz (also der gemittelten Intensität aller Moleküle ohne mNP) errechnet. In Anwesenheit eines Gold-NP wird weiterhin die Fluoreszenzlebensdauer verringert, welches auch im Experiment ersichtlich wird (Abbildung 64 D).

Atto647N hat am TO eine Fluoreszenzlebensdauer von 3,8 ns, während die Nähe des mNP die Fluoreszenzlebensdauer auf 0,73 ns (Nr 2, schwarz) und 0,46 ns (Nr 3, blau) verkürzt. Aus den Dunkelfeld-Aufnahmen können die Streuspektren der Gold-NPs erhalten werden. In Abbildung 64 E ist das Streuspektrum für das Molekül Nr 2 abgebildet. Das Streumaximum befindet sich bei der aus Abbildung 63 ermittelten mittleren Wellenlänge von 553 nm und entspricht somit dem zu erwartenden Spektrum für einen Monomer. Zudem ist keine Abhängigkeit von der Polarisierung des Lichtes vorhanden. Auch die Fluoreszenzdaten (5-fache Verstärkung, 0,73 ns Fluoreszenzlebensdauer) deuten auf einen einzelnen mNP hin. Das zweite Streuspektrum hingegen zeigt eine deutliche Rot-Verschiebung mit minimaler Amplitudenänderung bei unterschiedlichen Polarisierungen. Dies spricht dafür, dass dieses Gold-NP deutlich größer ist als die angenommenen 60 nm Durchmesser. Ebenso bestätigen die erhöhte Fluoreszenzverstärkung (13-fach) und die kürzere Fluoreszenzlebensdauer (0,46 ns) diese Annahme. Unter Verwendung von Gleichung (58) ergibt sich ein Durchmesser von 125 nm für dieses Gold-NP.

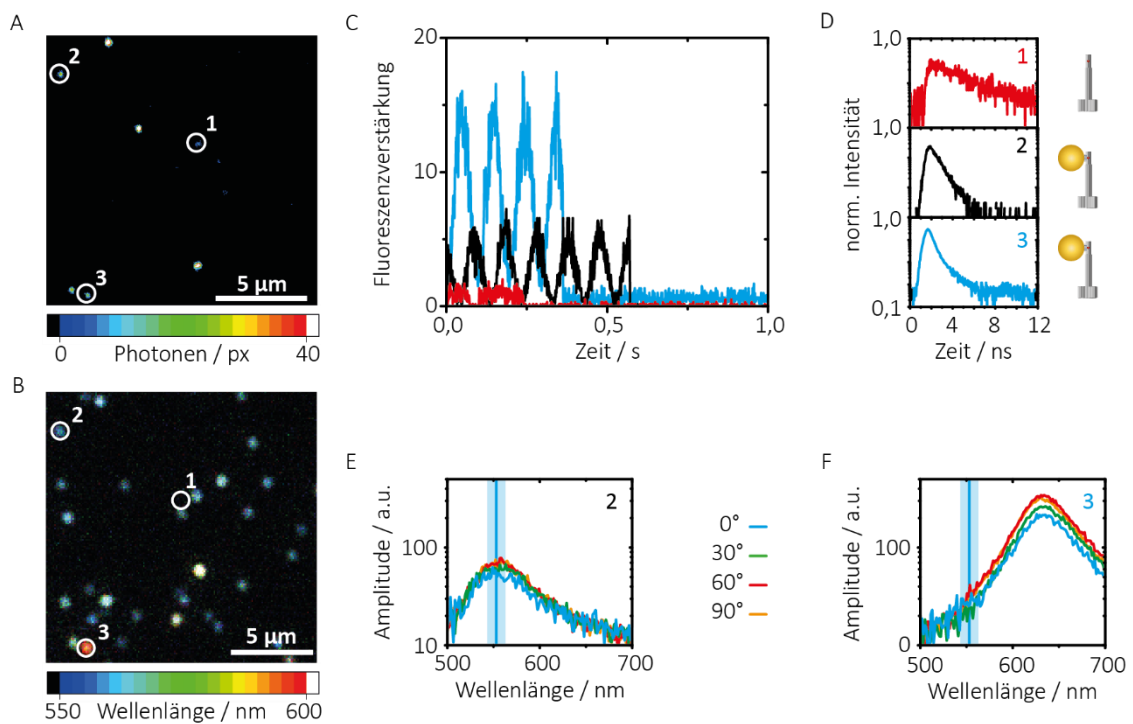


Abbildung 64: Beispiel der Messung der Nanoantenne mit 60 nm Gold-NP als Monomer. A) Fluoreszenzbild, B) Dunkelfeldbild. In den Bildern wurden drei Moleküle beispielhaft herausgesucht: eine Nanoantenne ohne Gold-NP (1) und zwei Nanoantennen mit einem metallischen Gold-NP (2 und 3). C) Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Zeit für die drei Moleküle (1: rot, 2: schwarz, 3: blau) und entsprechende Fluoreszenzabklingkurven (D) für die drei Nanoantennen. E) und F) Polarisationsabhängige Streuspektren der Nanoantennen 2 und 3. Die blaue Linie ( $553 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$ .

Um eine statistisch relevante Aussage treffen zu können, wurden mehrere Messungen der Monomer-Nanoantenne mit 60 nm Gold-NPs durchgeführt. Die Streuspektren wurden wie oben bereits erläutert nach ihrer Wellenlänge und Abhängigkeit von der Polarisierung sortiert. In Abbildung 65 A-L ist eine Auswahl an gemessenen Streuspektren, die den Erwartungen entsprechen, dargestellt. Diese zeigen ihr Maximum bei 553 nm und keine Abhängigkeit von der Polarisierung. Außerdem liegen alle in der Größe ihres Streuquerschnittes im gleichen Bereich. Demgegenüber sind in Abbildung 65 M-R eine Auswahl an Streuspektren dargestellt, die aufgrund der vorher genannten Kriterien ( $d\lambda_{\text{res}} < 10 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{mitt}} \pm 5\%$ ,

$A_{\text{scat}}(0^\circ) \sim A_{\text{scat}}(90^\circ)$ ) nicht dem zu erwartenden Verhalten entsprechen. Die Zahlen in den Graphen geben die aus der Fluoreszenzmessung ermittelte Fluoreszenzverstärkung für das jeweilige mNP an. Die Streuspektren zeigen eine Rot-Verschiebung um bis zu 90 nm für die Nanoantenne mit einer 14-fachen Fluoreszenzverstärkung (Abbildung 65 R) und auch für die Nanoantenne mit 5-facher Fluoreszenzverstärkung (Abbildung 65 P) eine Abhängigkeit der Wellenlänge und des Streuquerschnitts von der Polarisierung. Deuten alle Moleküle mit einer Rot-Verschiebung des Streuspektrums ohne signifikante Polarisationsabhängigkeit auf ein größeres mNP als 60 nm Durchmesser hin, so scheint die Nanoantenne mit 5-facher Verstärkung (P) ein Dimer zu sein. Dieser kann dadurch entstehen, dass ein zweites mNP sich zufällig in unmittelbarer Umgebung (<15 nm) zu dem ersten mNP an die Oberfläche lagert. Dies würde zu einer Veränderung des Streuspektrums führen ohne jedoch den Farbstoff merklich zu beeinflussen.

Die präsentierten Experimente zeigen, dass unter Verwendung der Dunkelfeldmikroskopie eine Sortierung der Nanoantennen in solche, die den Erwartungen entsprechen und solche, die von diesen abweichen, möglich ist. Dies wäre alleine auf Grundlage der Fluoreszenz-Informationen nicht möglich, da die Fluoreszenzverstärkung und die Fluoreszenzlebensdauer nicht alleine von der Größe und Form der mNP abhängig zu sein scheinen, sondern auch weitere Faktoren einen Einfluss haben. Welche diese im Einzelnen sind, wird später diskutiert.

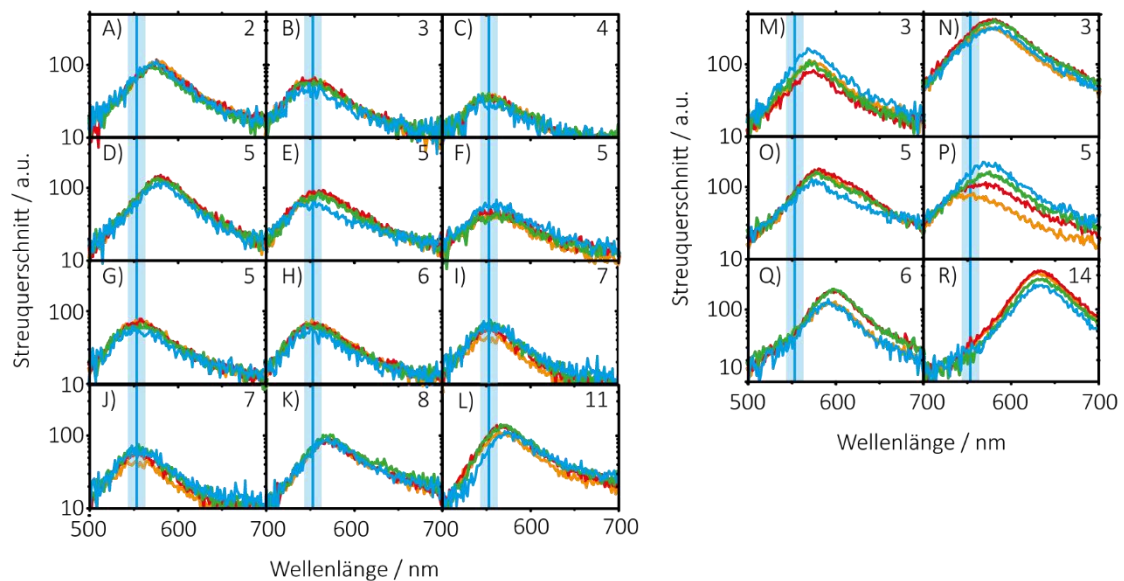


Abbildung 65: Ausgewählte Streuspektren der Nanoantennen mit einem 60 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $553 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. A-L) Monomere, die der erwarteten Form entsprechen. M-R) Monomere, die von der erwarteten Form abweichen. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin Nanoantennen mit 80 nm Gold- und Silber-NP (Abbildung A 22, 23 und Abbildung A 24, 25), sowie mit 100 nm Gold-NP untersucht. Während für 80 nm Gold-NP und 100 nm Gold-NP ähnliche Ergebnisse erzielt wurden wie für die 60 nm Gold-NP, zeigen die Messungen von 80 nm Silber-NP deutlich mehr Abweichungen in den Streuspektren. Bei den Gold-NP mussten weniger als die Hälfte der Nanoantennen aussortiert werden, während bei den Silber-NP über 90% nicht den gewählten Kriterien entsprachen. Dies liegt darin begründet, dass Silber zum einen eine viel reaktivere Oberflächenchemie aufweist und durch Sauerstoff sehr schnell oxidiert wird. Zum anderen sind die von BBI

Solutions hergestellten Silber-NP in ihrer Qualität bezüglich der Größe und Form von vornherein deutlich schlechter als die Gold-NP [85].

In Abbildung 66 A-D ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse für die Monomere mit 60 nm, 80 nm und 100 nm Gold-NP, sowie 80 nm Silber-NP nach der zuvor angegebenen Sortierung dargestellt. Bei den Dunkelfeld-Messungen wurde für jedes Molekül eine Mittelwertbildung über die erhaltenen Werte für die vier Polarisationen ( $0^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$ ) getroffen. In den Abbildungen sind sogenannte Box-Plots dargestellt. Die Box zeigt das Intervall an, in dem sich 50% aller Moleküle befinden (25%-75%). Die horizontale Linie innerhalb der Box ist der Median. Die Grenzbalken stellen den Bereich dar, in dem sich 80% aller Moleküle befinden (10%-90%). Die Punkte sind die erhaltenen Maxima und Minima. Um die Experimente wissenschaftlich einordnen zu können wurden Berechnungen der Veränderung der Anregungsrate und Quantenausbeute entsprechend der in Kapitel 2.2.5 vorgestellten Theorien von Bharadwaj et al. [55] durchgeführt, um mit ihnen die Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer (Abbildung 66 A) und der Fluoreszenzintensität (Abbildung 66 B) in Abhängigkeit von der Partikelgröße für Gold und Silber zu ermitteln. Für den Partikel-Farbstoff-Abstand wurden sechs Nanometer angenommen und für die intrinsische Quantenausbeute des Atto647N ein Wert von 0,65 [84]. Es ist zu sehen, dass die Verstärkung der Fluoreszenz umso größer ist, je größer der Partikeldurchmesser ist. Die Fluoreszenzlebensdauer hingegen verringert sich bei zunehmender Partikelgröße nur in einem so geringen Maße, dass dies vernachlässigt werden kann. Für 80 nm Silber-NP ist eine stärkere Fluoreszenzverstärkung zu verzeichnen bei gleichzeitig aber auch geringerer Fluoreszenzlebensdaueränderung im Vergleich zum Gold-NP derselben Größe. Woran dies liegt, wird später im Detail diskutiert.

In Abbildung 66 A-D sind die experimentellen Ergebnisse dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Fluoreszenzlebensdauer (A) bei Anbringen von mNP stark abnimmt und der Einfluss größer wird, je größer das mNP ist. Des Weiteren nimmt die Fluoreszenzverstärkung (B) mit Größe der mNP zu. Diese Tendenz korreliert mit den Berechnungen. Die Abweichung der Absolutwerte liegt darin begründet, dass bei den Berechnungen angenommen wurde, dass das Farbstoffmolekül sich in einer festen Orientierung befindet, die parallel zum elektrischen Feld des mNP ausgerichtet ist. Da in der Realität das Farbstoffmolekül aber rotiert, ist die Kopplung zwischen dem Farbstoff und dem mNP im Mittel geringer und so kommt es zu einer geringeren Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer und einer stärkeren Veränderung der Fluoreszenzverstärkung. Zudem konnte anhand der Messungen auch gezeigt werden, dass bei zunehmender mNP-Größe auch die Streuwellenlänge und der Streuquerschnitt wie erwartet zunehmen (siehe Abbildung 66 C und D).

Abgesehen von der Partikelgröße nimmt auch die Partikelart Einfluss auf die Kopplung. Obwohl die 80 nm Silber-NP eine Streuwellenlänge im blauen Bereich haben (siehe Abbildung 66 C) und somit eine schlechtere Kopplung zwischen dem Farbstoff und dem mNP zu erwarten ist, ist Silber im gleichen Maße wie Gold in der Lage, die Fluoreszenzlebensdauer zu reduzieren und die Fluoreszenz zu verstärken (Abbildung 67 A-D).



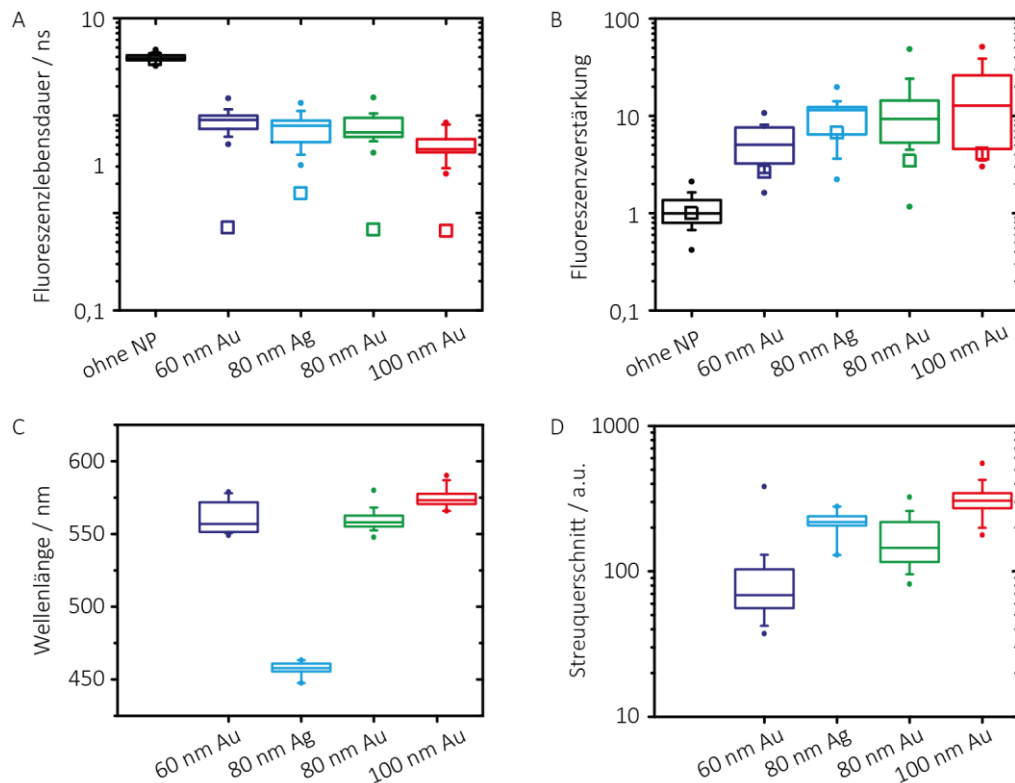


Abbildung 66: A-D) Ergebnisse der Messungen der Nanoantenne mit unterschiedlichen Gold-NP-Größen und einem Silber-NP, sowie die Referenz ohne mNP. Die Box umfasst alle Moleküle, die sich innerhalb des Intervalls von 25-75% befinden, wohingegen die Grenzbalken noch die Moleküle zwischen 10-90% einbeziehen. Die Punkte stellen die Maxima und Minima der Probe dar. Die Linie innerhalb der Box ist der Median. Berechnungen der Fluoreszenzlebensdauer (A) und der Fluoreszenzverstärkung (B) in Abhängigkeit von der NP-Größe unter Zuhilfenahme des aufgestellten Modells von Bharadwaj et al. [55] werden als kleine Quadrate dargestellt.

Werden die Absorptionsspektren von 80 nm Gold-NP mit denen des Silbers verglichen (Abbildung 67 A), so wird deutlich, dass Gold viel stärker in dem relevanten Spektralbereich (600 nm – 700 nm) absorbiert und auch sein Maximum viel näher bei der Emissionswellenlänge des Farbstoffmoleküls liegt. Dies bedeutet, dass ein Farbstoff in der Nähe eines 80 nm Gold-NP einen Teil seiner Energie nicht-radiativ an das Gold abgibt und so die Quantenausbeute verringert wird. Im Fall von Silber ist die Absorption viel geringer und so verringert sich kaum die Quantenausbeute des Farbstoffmoleküls. Das zweite Phänomen, das auftritt, ist die Fluoreszenzverstärkung durch das erhöhte elektrische Feld um das mNP. Das Streuspektrum von Gold-NP ist zwar im Vergleich zu den Silber-NP näher an dem Spektrum von Atto647N, jedoch ist der Streuquerschnitt von Silber insgesamt deutlich höher. Dies ergibt sich dadurch, dass der Streuquerschnitt nicht alleine von der Partikelgröße, sondern auch von der dielektrischen Leitfähigkeit  $\epsilon(\omega)$  des Materials abhängt. In Abbildung 67 D ist zu sehen, dass sich der Streuquerschnitt von 80 nm Silber-NP zwischen dem von 80 nm Gold-NP und 100 nm Gold-NP befindet. Dies korreliert mit der Fluoreszenzverstärkung, die sich bei 80 nm Silber-NP zwischen der von 80 nm Gold-NP und 100 nm Gold-NP befindet. Dies führt für Farbstoffmoleküle in der Nähe von Silber- und Gold-NP so zu einer Fluoreszenzverstärkung, wobei anzunehmen ist, dass diese für Silber-NP etwas geringer ausfällt als für Gold-NP. Mittels der Absorption und der Streuung lassen sich so bereits Rückschlüsse auf das Verhalten der Farbstoffmoleküle in der Nähe der mNP ziehen, allerdings ist noch nicht eindeutig zu sagen, ob insgesamt für Silber-NP oder für Gold-NP eine höhere Fluoreszenzverstärkung zu erwarten ist. Mithilfe der in Kapitel 2.2.5 vorgestellten Dipol-Annäherung können die Veränderungen der Anregungsrate, der Quantenausbeute, der Fluoreszenzverstärkung und der Fluoreszenzlebensdauer kalkuliert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 67 C-F



dargestellt. Hier zeigt sich, dass die aus den Spektren geschlossene Vermutung, dass die Anregungsrate für Gold (Faktor 7,1) etwas mehr erhöht wird als für Silber (Faktor 6,5), stimmt. Gleichzeitig erfährt die Quantenausbeute für Silber eine minimale Erhöhung von 0,65 für Atto647N auf 0,67, während die Quantenausbeute für den Farbstoff in der Nähe von Gold deutlich reduziert wird (auf 0,32). Die Fluoreszenzverstärkung ist dementsprechend für Silber höher als für Gold (3,5 für Gold, 6,7 für Silber). Dies zeigt, dass bei dem angenommenen Abstand von 6 nm für ein Gold-NP die Verringerung der Fluoreszenz durch nicht-radiative Übergänge deutlich gegenüber der Anregungsratenverstärkung durch das verstärkte elektrische Feld gewinnt. Dies hat zur Folge, dass die Fluoreszenzverstärkung für Silber-NP höher ist als für Gold-NP. Da die Quantenausbeute proportional zur Fluoreszenzlebensdauer ist, verringert sich letztere durch die Nähe zu einem Gold-NP stärker als zu einem Silber-NP (Abbildung 67 F). Auch dies konnte experimentell gezeigt werden (Abbildung 66 C).

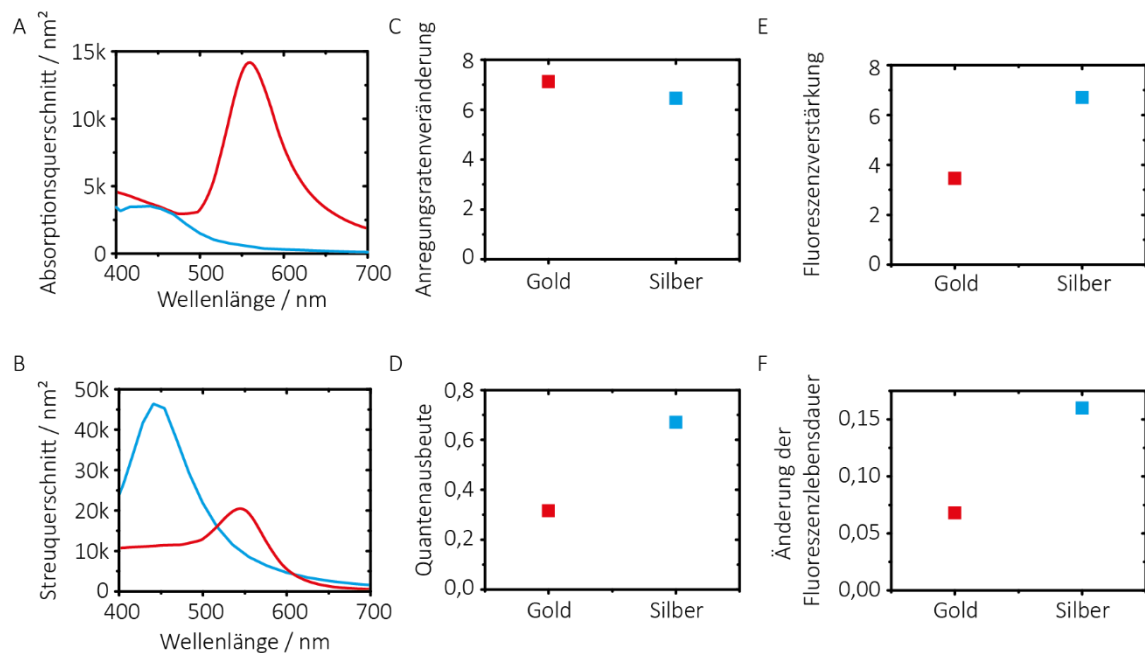


Abbildung 67: A) Absorptionsspektrum und B) Streuspektrum von 80 nm Silber-NP (blau) und 80 nm Gold-NP (rot). C-F) Berechnungen entsprechend der Veröffentlichung von Bharadwaj et al. [55].

#### 4.3.2.2. Das Dimer

Wird an das turmförmige DNA-Origami ein zweites mNP angebracht, entsteht ein sogenanntes Dimer. Ist dieses parallel zum äußeren elektrischen Feld ausgerichtet, koppeln die lokalisierten Oberflächenplasmonen beider mNP miteinander, und es entsteht ein verstärktes elektrisches Feld zwischen den beiden mNP. Dieses verstärkte Feld führt zu einer noch größeren Fluoreszenzverstärkung als beim Monomer, da die Anregungsrate proportional zum Quadrat des elektrischen Feldes ist ( $k_{\text{exc}} \propto |E|^2$ ). Die erhöhte Fluoreszenzverstärkung beim Dimer im Vergleich zum Monomer ist experimentell nachgewiesen worden. In Abbildung 68 ist als Beispiel eine Messung der Nanoantenne mit zwei 60 nm großen Gold-NP dargestellt. Aus den Messungen wurden beispielhaft drei Moleküle ausgewählt. Bei Nanoantenne 1 kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen Monomer handelt, da bereits in dem Fluoreszenzbild (Abbildung 68 A) zu sehen ist, dass dieses Molekül wesentlich dunkler als die beiden anderen ausgewählten Moleküle ist. Dies zeigt sich auch in der Fluoreszenz-Zeit-Spur (Abbildung 68 B) in einer nur 1,8-fach verstärkten Fluoreszenz. Zudem ist die Fluoreszenzlebensdauer auf 0,4 ns reduziert,

was ausschließt, dass es eine Nanoantenne ohne Gold-NP ist (Abbildung 68 C). Des Weiteren ist auch das Gold-NP im Dunkelfeld-Bild (Abbildung 68 D) dunkel und blau gefärbt, welches für eine niedrige Wellenlänge spricht. Das Dunkelfeldspektrum zeigt außerdem keine Veränderung in der Wellenlänge oder dem Streuquerschnitt bei unterschiedlichen Polarisationen (Abbildung 68 E). Werden hingegen die Nanoantennen 2 und 3 betrachtet, so ist eine höhere Fluoreszenz erkennbar (Abbildung 68 A, B), die mit einer verringerten Fluoreszenzlebensdauer (Abbildung 68 C) einhergeht. Nanoantenne 3 hat eine 80-fache Fluoreszenzverstärkung mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 0,2 ns, während Nanoantenne 2 eine 30-fache Fluoreszenzverstärkung bei einer Fluoreszenzlebensdauer von 0,2 ns hat. Dies deutet bereits darauf hin, dass die Nanoantenne 3 eine stärkere Kopplung zwischen Gold-NP und Atto647N hat als die Nanoantenne 2. Dies zeigt sich auch in den Streuspektren, die beide eine starke Abhängigkeit von der Polarisierung des Lichts aufweisen und sowohl eine Rot-Verschiebung, als auch eine Verstärkung ihrer Amplitude haben. Die beiden Nanoantennen unterscheiden sich in ihren Streuspektren allerdings stark, da die Nanoantenne 2 der zu erwartenden Verschiebung von 553 nm zu 578 nm entspricht, wohingegen die Nanoantenne 3 eine deutlich stärkere Rot-Verschiebung zu 617 nm zeigt.

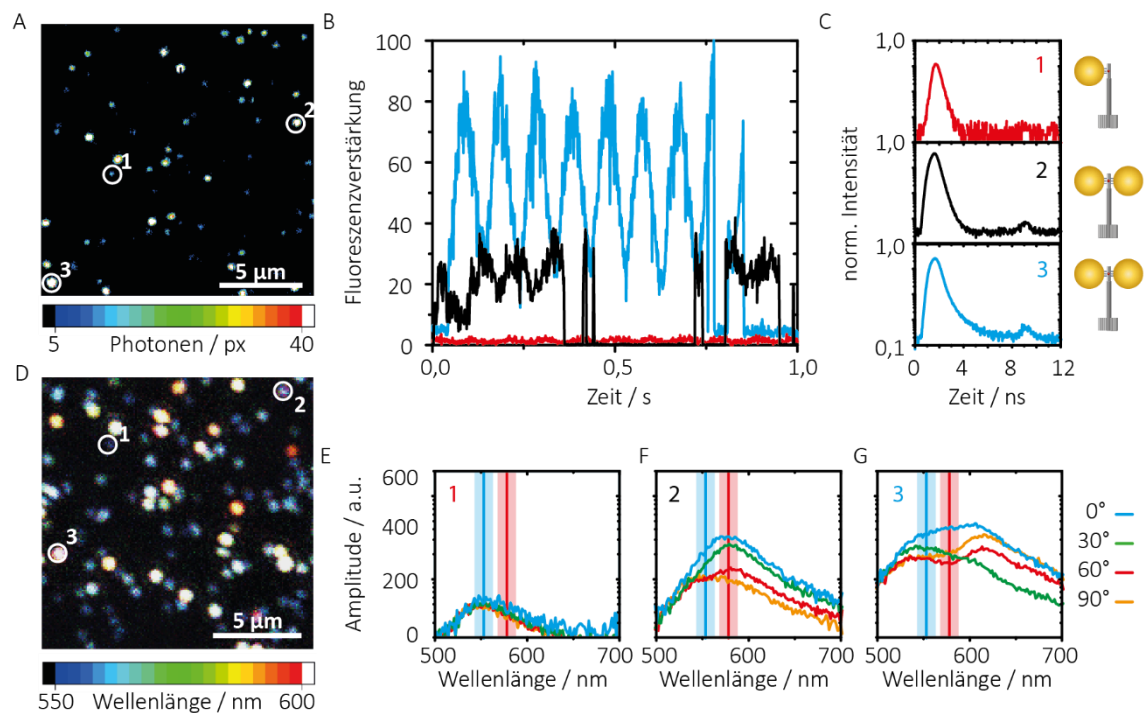


Abbildung 68: Beispiel der Messung der Nanoantenne mit 60 nm Gold-NP als Dimer. A) Fluoreszenzbild, B) Dunkelfeldbild. In den Bildern wurden drei Moleküle beispielhaft herausgesucht: eine Nanoantenne mit einem Gold-NP (1) und zwei Nanoantennen mit zwei Gold-NP (2 und 3). C) Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Zeit für die drei Moleküle (1: rot, 2: schwarz, 3: blau) und entsprechende Fluoreszenzabklingkurven (D) für die drei Nanoantennen. E) und F) Polarisationsabhängige Streuspektren der Nanoantennen 1, 2 und 3. Die blaue Linie ( $553 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge und die rote Linie bei  $578 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  die mittlere Rot-Verschiebung des Dimers. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$ .

All diese Faktoren zusammen sprechen zunächst dafür, dass es sich um Dimere handelt. Warum beide ein unterschiedliches Verhalten zeigen, ist anhand der Experimente nicht klar zu belegen. Einen nicht unerheblichen Einfluss wird die Form der beteiligten Gold-NP haben. Wie bereits bei den Monomer-Messungen gezeigt wurde, ist die Form und Größe der mNP sehr unterschiedlich, sodass die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass zwei unterschiedlich geformte mNP einen Dimer bilden.

Alle möglichen Kombinationen durch Simulationen vorherzusagen, ist jedoch eine Aufgabe, deren Aufwand den Nutzen weit übersteigen würde.

Um eine statistisch relevante Aussage treffen zu können, wurden mehrere Messungen der Dimer-Nanoantenne mit 60 nm Gold-NP durchgeführt. Die Streuspektren wurden wie oben bereits erläutert nach ihrer Wellenlänge und Abhängigkeit von der Polarisation ( $d\lambda_{\text{res}} < 10 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{mitt}} \pm 5\%$ ,  $A_{\text{scat}}(0^\circ) \sim A_{\text{scat}}(90^\circ)$ ) sortiert. Da die Probe nicht nur Dimere, sondern auch Monomere enthält, können die Monomere herausgesucht werden, um die Qualität der Messung zu überprüfen. In Abbildung 69 ist eine Auswahl an Monomer-Streuspektren dargestellt. Die Zahlen in den Graphen geben die aus der Fluoreszenzmessung ermittelte Fluoreszenzverstärkung für das jeweilige mNP an. Alle dargestellten Spektren haben ihr Maximum bei 553 nm und zeigen keine Abhängigkeit von der Polarisation. Dies zeigt, dass die Messung erfolgreich durchgeführt wurde und keine signifikanten Artefakte durch das Messverfahren die Ergebnisse beeinflussen.

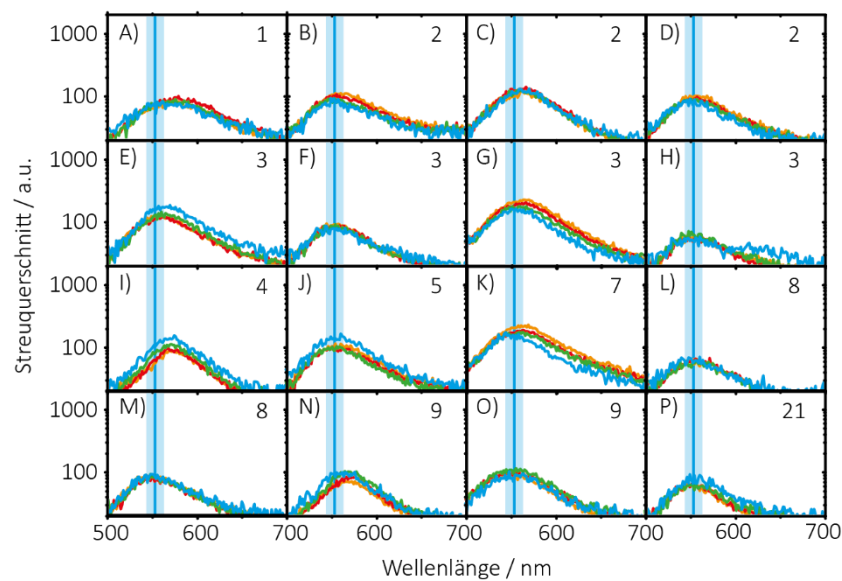


Abbildung 69: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantennen der Dimer-Probe mit nur einem 60 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $553 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

In Abbildung 70 sind ausgewählte Streuspektren der Dimere dargestellt. Die Graphen A-O) enthalten Streuspektren, bei denen die Rot-Verschiebung von 553 nm zu 578 nm erfolgte, während die Graphen P-T) Streuspektren enthalten, die eine stärkere Rot-Verschiebung aufweisen. Die stärkere Rot-Verschiebung deutet auf eine Verringerung des Abstands zwischen den beiden Gold-NP hin, da die Kopplung zwischen zwei mNP umso stärker wird, je näher sie sich kommen. In der Theorie sollte auch eine höhere Fluoreszenzverstärkung für Atto647N bei einem kürzeren Abstand zu den Gold-NP zu erwarten sein. Allerdings kann dies nicht durch die Messungen bestätigt werden. Tatsächlich ist sogar die größte Fluoreszenzverstärkung von 125-fach bei einem Gold-NP-Dimer zu verzeichnen, der keine große Rot-Verschiebung hat. Gründe, die die Fluoreszenzverstärkung weiterhin beeinflussen, werden in Kapitel 4.3.2.3 diskutiert.

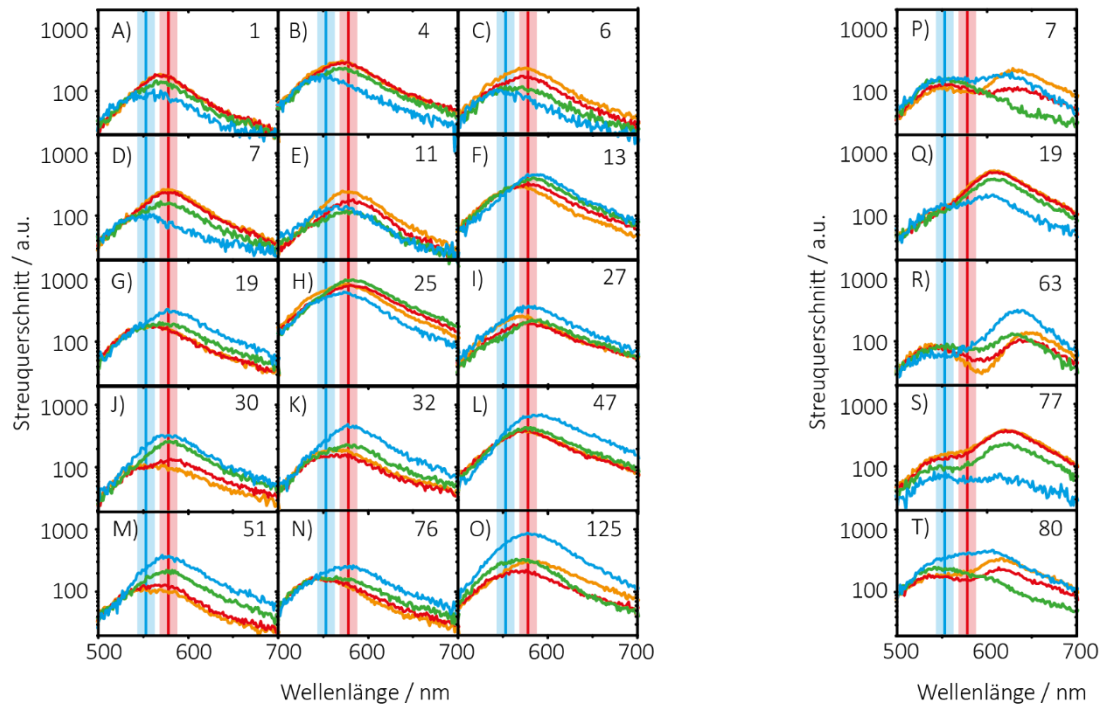


Abbildung 70: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantennen der Dimer-Probe mit zwei 60 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $553 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge und die rote Linie bei  $578 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  die mittlere Rot-Verschiebung des Dimers. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

Im Anhang sind weitere Experimente mit einem Dimer aus 80 nm Silber-NP (Abbildung A 28, 29, 30) und 100 nm Gold-NP (Abbildung A 31, 32, 33) zu sehen. Auch bei diesen Experimenten wurden jeweils drei Moleküle herausgesucht, bei denen eines ein Monomer darstellt und zwei vermutlich Dimere. Das Silber-Monomer (Abbildung A 28 Nanoantenne 1) hat eine Fluoreszenzverstärkung von 10 bei einer Fluoreszenzlebensdauer von 0,7 ns. Die Streuwellenlänge liegt bei etwa 467 nm und ist nicht polarisationsabhängig. Die Nanoantenne 2 zeigt hingegen eine 30-fache Fluoreszenzverstärkung bei einer geringeren Fluoreszenzlebensdauer von 0,5 ns und einer Streuwellenlänge, die stark von der Polarisation abhängig ist. Die Nanoantenne 3 weist eine noch größere Fluoreszenzverstärkung von 140-fach auf bei gleichzeitiger noch stärker verringerter Fluoreszenzlebensdauer von 0,3 ns. Auch hier ist die Streuwellenlänge stark von der Polarisation abhängig, allerdings ist der Streuquerschnitt verringert im Vergleich zum Monomer und die Form der Spektren sieht im Vergleich zu Nanoantenne 2 deutlich anders aus. Daraus kann geschlossen werden, dass die Nanoantenne 1 ein Monomer ist, wohingegen die Nanoantennen 2 und 3 vermutlich Dimere sind. Das 100 nm Gold-Monomer (Abbildung A 31 Nanoantenne 1) zeigt wie zu erwarten eine leichte Fluoreszenzverstärkung von 6-fach bei einer stark verringerten Fluoreszenzlebensdauer von 0,2 ns. Damit befindet sich die Fluoreszenzlebensdauer bereits in einem Bereich, bei dem es technisch nicht mehr möglich ist, eine saubere Entfaltung durchzuführen, da bereits die Breite der IRF des Lasers die der Fluoreszenzabklingkurve überlagert. Die Streuwellenlänge liegt bei etwa 571 nm und ist unabhängig von der Polarisation. Damit ist die Nanoantenne 1 eindeutig als Monomer zu identifizieren. Die Nanoantennen 2 und 3 haben jeweils eine Fluoreszenzverstärkung von 47-, bzw. 168-fach bei einer Fluoreszenzlebensdauer von jeweils 0,2 ns. In beiden Fällen sind Streuwellenlänge und Streuquerschnitt stark polarisationsabhängig. Dies deutet auf ein Dimer hin. Allerdings sehen auch hier beide Streuspektren deutlich unterschiedlich

aus, was vermutlich darin begründet liegt, dass die einzelnen Nanopartikel jeweils unterschiedlich aussehen (z.B. Form/Größe).

Insgesamt ist es schwierig, detektierte Moleküle eindeutig als Dimere zu identifizieren, da bereits bei den Monomer-Messungen gezeigt wurde, dass es Gold-NP gibt, die in ihrem Verhalten von dem erwarteten abweichen. Während Monomere eindeutig zugeordnet werden können, ist bei den Dimeren also nie auszuschließen, dass es sich auch um Aggregate oder nicht-sphärische mNP handeln kann.

In Abbildung 71 A-D ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse für die Messungen der Dimere mit 60 nm und 100 nm Gold-NP, sowie 80 nm Silber-NP nach der zuvor angegebenen Sortierung dargestellt. Bei den Dunkelfeld-Messungen wurde für jedes Molekül eine Mittelwertbildung über die erhaltenen Werte für die vier Polarisierungen ( $0^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$ ) getroffen. In den Abbildungen sind sogenannte Box-Plots dargestellt. Die Box zeigt das Intervall an, in dem sich 50% aller Moleküle befinden (25%-75%). Die horizontale Linie innerhalb der Box ist der Median. Die Grenzbalken stellen den Bereich dar, in dem sich 80% aller Moleküle befinden (10%-90%). Die Punkte sind die erhaltenen Maxima und Minima.

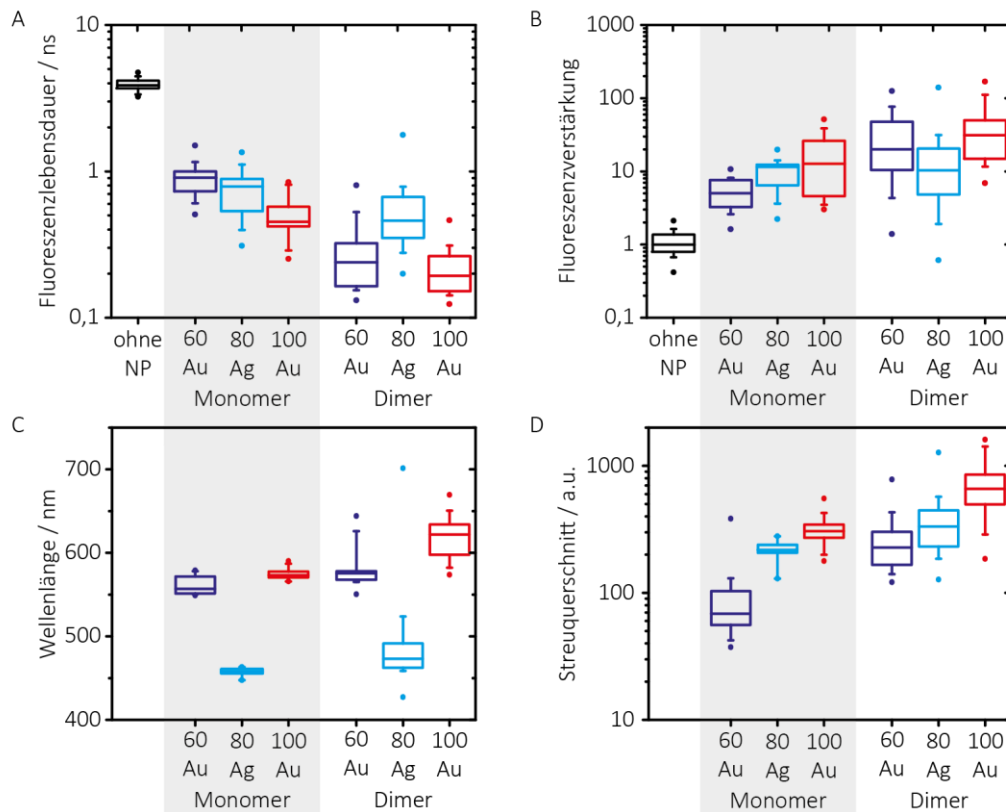


Abbildung 71: Vergleich der A) Fluoreszenzlebensdauern und der B) Fluoreszenzverstärkung, sowie der C) Streuwellenlängen und der D) Streuquerschnitte des Dimers mit dem Monomer und der Referenz für unterschiedliche mNP.

In Abbildung 71 A und B ist zu sehen, dass die Fluoreszenzlebensdauer für die Dimere deutlich gegenüber den Monomeren verringert wird sowie auch die Fluoreszenzverstärkung für den Dimer deutlich erhöht wird. Durch die Aufnahme von den Streuspektren der mNP ist zudem auch zu sehen, dass die Streuwellenlänge eine Rot-Verschiebung für den Dimer im Vergleich zum Monomer aufweist sowie auch einen größeren Streuquerschnitt. Obwohl bei den Silber-NP Streuwellenlänge und Streuquerschnitt beim Dimer zunehmen, bleibt die mittlere Fluoreszenzverstärkung ungefähr gleich. Die Breite der

Verteilung nimmt hingegen bei der Fluoreszenzlebensdauer und –Verstärkung sowie der Streuwellenlänge und dem Streuquerschnitt zu.

Um besser nachvollziehen zu können, warum dies so ist, sind im Anhang in Abbildung A 34 die Fluoreszenzverstärkung gegen die Fluoreszenzlebensdauer von 80 nm Silber, 60 nm und 100 nm Gold für die Dimer- und die Monomer-Probe dargestellt. Für 60 nm Gold-NP ist eine deutliche Abgrenzung zwischen den Populationen des Dimers und des Monomers anhand der Fluoreszenzlebensdauer möglich. Auch bei 100 nm Gold ist noch eine grobe Trennung zu sehen, wobei der Bereich, in dem sich die Populationen überlappen, bereits größer ist. Bei der Silber-Probe fällt die Trennung deutlich schwerer. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass bereits das Monomer eine breite Verteilung aufweist, welches sowohl an der Form der Partikel, als auch an deren komplizierterer Oberflächenchemie liegen kann. Es zeigte sich bereits in den Messungen, dass bei Silber ein deutlich höherer Ausschuss zu verzeichnen ist als bei Gold. Konnten bei dem Monomer aus 80 nm Gold-NP 54% aller untersuchten Moleküle noch in die Auswertung mit einbezogen werden, so blieben bei dem Monomer aus 80 nm Silber-NP nur 9% übrig, die die geforderten Kriterien (blinken/bleichen auf den Hintergrund, richtige Streuwellenlänge, Unabhängigkeit von der Polarisierung) erfüllen konnten. Dies erschwert die Sortierung der Messungen des Dimers nach Monomeren, Dimeren und mNP, die nicht den Kriterien entsprechen. Bei einem Vergleich der Streuspektren für Silber- und Gold-NP in Abbildung A 29/Abbildung A 30 und Abbildung A 32/Abbildung A 33 ist bereits zu erkennen, dass bei den Silber-NP die Unterscheidung zwischen Monomer und Dimer deutlich schwieriger ist als bei den Gold-NP.

Um einen Versuch zu unternehmen das Verhalten der Silber-Dimere zu beschreiben wurden Simulationen von Guillermo Acuna [86] erstellt. In Abbildung 72 ist ein Vergleich von 80 nm Silber-Monomer und –Dimer und 80 nm Gold-Monomer und -Dimer dargestellt. Hier ist zu sehen, dass die Quantenausbeute (Abbildung 72 A) für einen Dimer bei Silber zwar größer ist als bei Gold, was für eine höhere Fluoreszenzverstärkung spricht, allerdings ist die elektrische Feldverstärkung (Abbildung 72 A) viel größer bei einem Gold-Dimer. Da ein größerer Unterschied in der Feldverstärkung vorliegt als in der Quantenausbeute bedeutet dies, dass bei gleicher Größe ein Dimer aus Gold-NP zu einer größeren Fluoreszenzverstärkung führt als ein Dimer aus Silber-NP. Auch die Absorptions- und Streuquerschnitte bestätigen diese Theorie. Während ein Dimer aus Silber-NP eine deutliche Rot-Verschiebung des Absorptionsquerschnitts erfährt, ändert sich dieser für Gold-NP kaum. Allerdings ist der Absorptionsquerschnitt bei Gold-NP deutlich größer als bei Silber-NP, welches wiederum zu einer größeren Verringerung der Quantenausbeute führt. Beim Streuquerschnitt hingegen kommt es sowohl für Silber-NP als auch für Gold-NP zu einer Rot-Verschiebung vom Monomer zum Dimer. Da in dieser Arbeit ein Farbstoff verwendet wurde, der rotes Licht absorbiert (640 nm), ist die elektrische Feldverstärkung bei Gold deutlich größer als bei Silber.

Um zu ermitteln, ob und wie stark die Fluoreszenzlebensdauer, die Fluoreszenzverstärkung, die Streuwellenlänge und der Streuquerschnitt für alle gemessenen DNA-Nanoantennen jeweils miteinander (linear) korrelieren, wurde der Korrelationskoeffizient  $R_{xy}$  berechnet und ein Hypothesentest (Steiges Z-Test) durchgeführt.  $t_{n-2;1-\alpha/2}$  ist die zweiseitige Quantil der Student-Verteilung und T die Teststatistik. Als Hypothese wurde angenommen, dass keine Korrelation besteht. Die Ergebnisse sind im Anhang in

Tabelle 4 für die Monomere und Tabelle 5 für die Dimere dargestellt. Es wurde die Fluoreszenzlebensdauer mit der Fluoreszenzverstärkung korreliert, die Fluoreszenzlebensdauer mit der Streuwellenlänge, die Fluoreszenzlebensdauer mit dem Streuquerschnitt, die Fluoreszenzverstärkung mit der Streuwellenlänge, die Fluoreszenzverstärkung mit dem Streuquerschnitt und die Streuwellenlänge mit dem Streuquerschnitt jeweils für die unterschiedlichen Monomere und Dimere. Es ist zu sehen, dass nur sehr schwache bis gar keine linearen Korrelationen vorhanden sind. Eine starke lineare Korrelation der Werte untereinander würde einen Korrelationskoeffizienten von  $+1/-1$  ergeben. Farblich markiert sind die Proben bei denen der Hypothesentest das Ergebnis widerlegt hat. Diese nichtlineare Abhängigkeit zeigt, wie komplex die DNA-Origami Nanoantenne ist und dass weitergreifende Untersuchungen nötig sind, um die einzelnen Parameter zu analysieren, die die Fluoreszenzverstärkung beeinflussen.

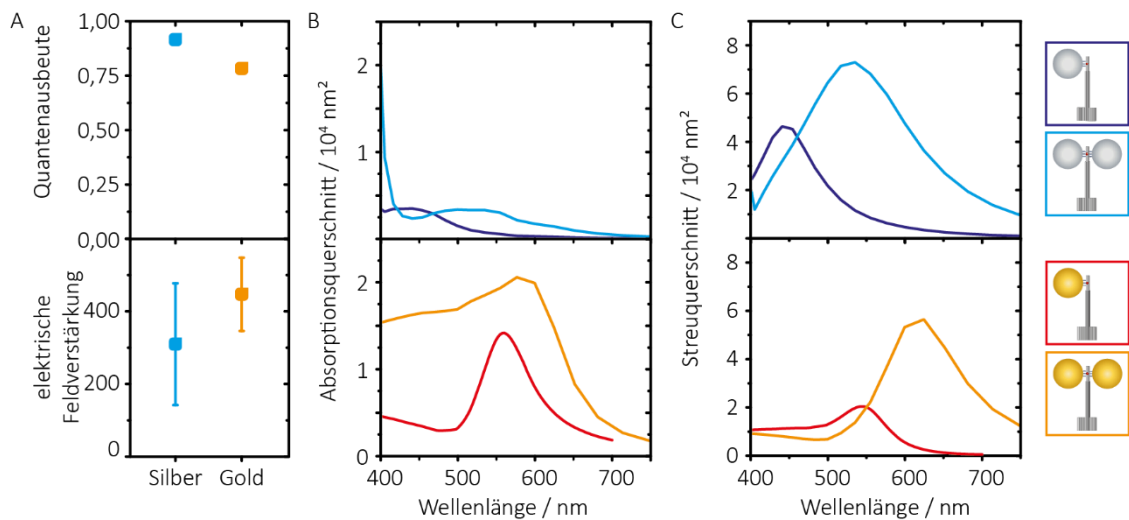


Abbildung 72: A) Berechnete Quantenausbeute und elektrische Feldverstärkung für ein Dimer aus je 80 nm Silber und 80 nm Gold. B) Numerische Berechnungen des Absorptionsquerschnitts (B) und des Streuquerschnitts (C) von Dr. G. Acuna [86].

#### 4.3.2.3. Abweichungen

Es können eine Reihe Gründe aufgezählt werden, die im Experiment zu Abweichungen von den zu erwartenden (simulierten) Ergebnissen führen. Die größten Einflüsse werden im Folgenden beschrieben. Zunächst ist zu erwähnen, dass Atto647N ein Farbstoff ist, der dazu tendiert, an DNA zu haften. Dies führt wiederum dazu, dass er in einer ungünstigen Position zum mNP und somit auch zur Polarisation des Anregungslichtes orientiert sein kann. In diesem Fall wird die Kopplung zwischen dem mNP und dem Farbstoff verringert und im schlechtesten Fall kann es sogar zu einer Fluoreszenzverringern (siehe Abbildung 20, Kapitel 2.2.5) kommen. Dies kann umgangen werden, indem ein anderer Farbstoff verwendet wird. Aktuell gibt es allerdings wenige Farbstoffmoleküle, die die Anforderungen erfüllen. Das Farbstoffmolekül muss frei rotieren können, sollte langlebig sein und eine stabile Fluoreszenz haben. Für die Unterscheidung zwischen Monomer und Dimer sollte er weiterhin auch eine lange Fluoreszenzlebensdauer haben. Ein Farbstoff, der gegebenenfalls diese Anforderungen erfüllt, ist Alexa647 unter Sauerstoffentzug und mit ROXS. Abgesehen von dem Farbstoff gibt es noch weitere Ursachen für die Inhomogenität der Messungen. Eine davon beinhaltet, dass das DNA-Origami nicht gerade auf der Oberfläche steht, bzw. Einflüsse der Schwerkraft auf das mNP zu einem Verbiegen der Struktur führen. In diesem Fall befindet sich das Farbstoffmolekül nicht mehr an der besten Position, um mit dem mNP die maximale Kopplung zu erreichen, und es kommt zu einer geringeren Fluoreszenzverstärkung. Um diesen Fall zu umgehen, wird ein anderes DNA-Origami benötigt bzw. eine



andere Methode, die Nanoantenne auf einer Glasoberfläche zu immobilisieren. Eine getestete Variante ist in Kapitel 4.3.2.5. beschrieben. Weiterhin hat die Heterogenität der mNP einen großen Einfluss auf die Fluoreszenzverstärkung. In Abbildung 73 A, B sind von S. Carregal Romero durchgeführte TEM-Aufnahmen und Histogramme über die Durchmesser von Gold-NP unterschiedlicher Größen (BBI Solutions) dargestellt. Es ist zu sehen, dass gerade bei größeren Durchmessern die Heterogenität, und somit auch die Breite der Verteilung, deutlich zunimmt. Aktuell arbeiten mehrere Arbeitsgruppen weltweit an der Synthese sogenannter ultrasphärischer mNP [87, 88]. Bei diesen ist allerdings die Funktionalisierung mit DNA über Thiol erschwert und so müssen neue Methoden entwickelt werden, die DNA an die mNP zu binden. Die Arbeitsgruppe um Sebastian Schlücker von der Universität Duisburg-Essen arbeitet aktuell an der Funktionalisierung ultrasphärischer Gold-NP unterschiedlicher Größen mit DNA. Eine Probe der 74 nm großen Gold-NP mit DNA konnte bereits mit Dunkelfeldmikroskopie untersucht werden. Hier wurden allerdings nur die Gold-NP untersucht, die elektrostatisch an das Glas einer Flusskammer gebunden wurden.

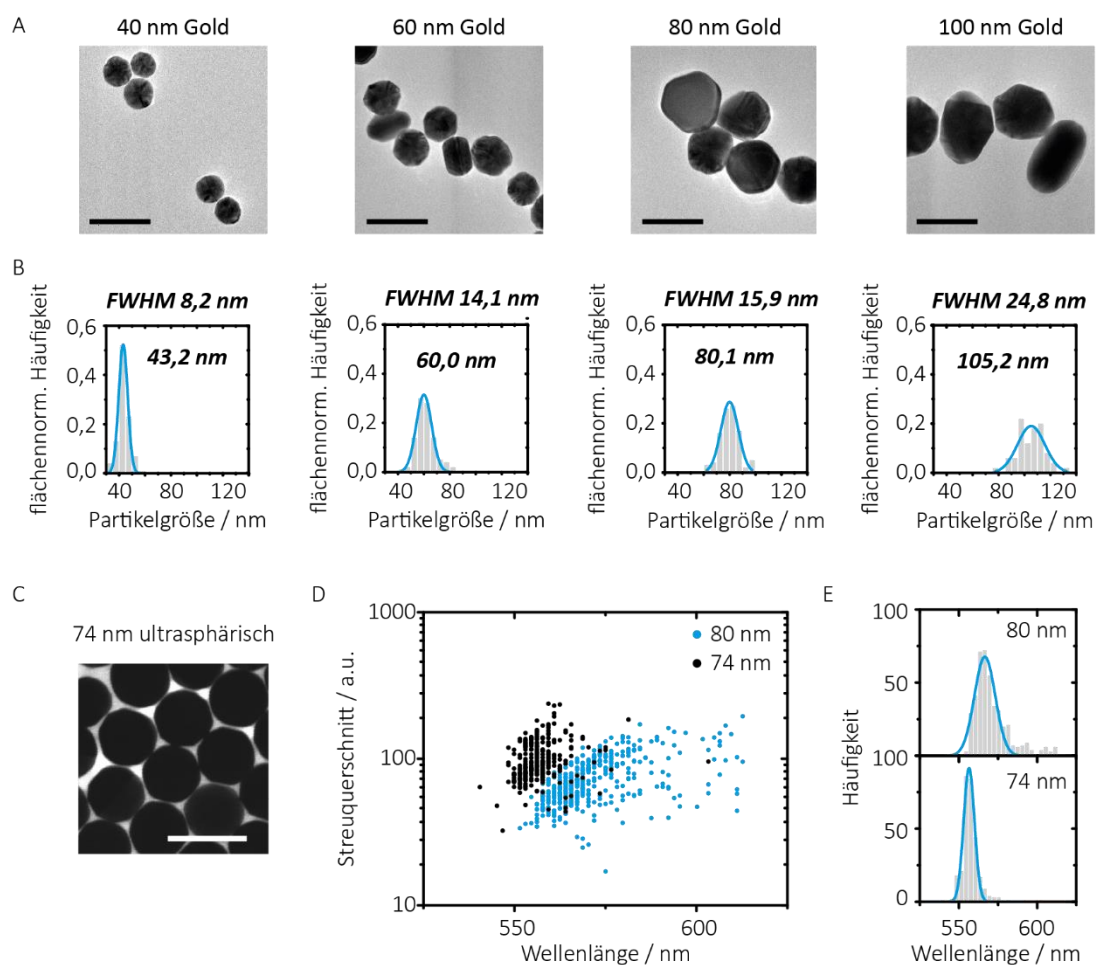


Abbildung 73: A) TEM-Aufnahmen der von BBI Solutions erworbenen Gold-NP unterschiedlicher Größen (von S. Carregal Romero, [24]). Skalierung: 100 nm. B) Histogramme über die Durchmesser der Gold-NP aus (A). Mit einem Gauß-Fit wurde die FWHM und der durchschnittliche Durchmesser ermittelt. C) SEM-Aufnahme der ultrasphärischen Gold-NP mit einem Durchmesser von 74 nm (von S. Schlücker, 2017). Skalierung: 100 nm. D) Auftragung des Streuquerschnitts gegen die Wellenlänge für die 80 nm Gold-NP von BBI Solutions und die 74 nm ultrasphärischen Gold-NP von der Arbeitsgruppe Schlücker. E) Histogramme über die Wellenlänge der 80 nm Gold-NP von BBI Solutions und der 74 nm ultrasphärischen Gold-NP von der Arbeitsgruppe S. Schlücker.



Die SEM-Aufnahmen, welche durch Mitarbeiter der AG Schlücker erstellt wurden, zeigen deutlich, dass die Gold-NP eine viel gleichmäßigere Form und Größenverteilung haben als die Gold-NP von BBI Solutions (siehe Abbildung 73 C). Auch die Dunkelfeld-Aufnahmen zeigen eine deutlich breitere Verteilung für die Gold-NP von BBI Solutions im Vergleich zu den ultrasphärischen Gold-NP (siehe Abbildung 73 D). Die Halbwertsbreite der Verteilung liegt für die 80 nm Gold-NP bei 13 nm während sie bei den ultrasphärischen Gold-NP nur noch einen Wert von 7 nm hat. Der Grund dafür, dass auch die ultrasphärischen Gold-NP noch immer eine etwas breitere Verteilung aufweisen, kann mit der SEM-Aufnahme erklärt werden. Dort ist zu sehen, dass auch die ultrasphärischen Gold-NP immer noch Kanten haben und in ihrer Größe minimal voneinander abweichen. Trotzdem ist bereits ein deutlicher Vorteil gegenüber den herkömmlichen 80 nm Gold-NP von BBI Solutions zu sehen.

Ein weiterer Grund für die breite Verteilung der Fluoreszenzverstärkung ist, dass die DNA-Stränge auf dem Gold-NP zufällig verteilt sind, sodass es zu einer Anbindung kommen kann, bei der die DNA-Stränge so weit auseinander sind, dass sie nicht mit der gesamten Anzahl an Nukleotiden an das DNA-Origami binden können. Zudem kann es auch dazu kommen, dass sich DNA-Stränge vom Gold-NP lösen, frei in dem Puffer diffundieren und an einen DNA-Strang des DNA-Origamis anbinden, sodass der Gold-NP nur an die zwei verbleibenden Stränge anbinden kann. Dies führt dazu, dass die Gold-NP und das Farbstoffmolekül sich nicht mehr in einer Ebene befinden und so die Kopplung zwischen dem Gold-NP und dem Farbstoff verschlechtert wird. Es gibt also viele Faktoren, die Einfluss auf die Homogenität der Proben haben.

#### 4.3.2.4. Wachstum der Gold-Nanopartikel an der DNA-Origami Nanoantenne

Die Fluoreszenzverstärkung eines Farbstoffmoleküls ist stark abhängig von dessen Abstand zu einem mNP. Vorangehend wurde bereits eine Methode beschrieben, wie dieser Abstand verringert werden kann. Durch das Anbinden in der (R)-Konfiguration konnte der Abstand zwischen dem Farbstoffmolekül und dem NP auf 6 nm reduziert werden. Um aber einen noch kleineren Abstand und somit eine noch größere Fluoreszenzverstärkung zu erreichen, muss eine neue Methode verwendet werden, da aufgrund der Geometrie des turmförmigen DNA-Origamis keine weitere Verringerung des Abstands mehr möglich ist. Im folgenden Kapitel wird beschrieben, wie nach dem Anbinden der Gold-NP an das auf Glas immobilisierte DNA-Origami ein Wachstum der Gold-NP durchgeführt wurde um so den Abstand zwischen Farbstoffmolekül und mNP zu verringern. Bisher gab es mehrere Ansätze mNP in Lösung wachsen zu lassen. Die von Niu et al. 2007 im Journal Nanotechnology [89] publizierte Methode verwendete nur Goldsäure und Mercaptobernsteinsäure und wurde in dieser Arbeit verwendet. Sie testeten unterschiedliche Verhältnisse an Goldsäure zu Gold-NP (15 nm Durchmesser) und erreichten ein Wachstum auf bis zu 150 nm. Dabei fanden sie heraus, dass das exakte Verhältnis von Mercaptobernsteinsäure zu Goldsäure 0,6:1 betragen muss, um eine ausreichend gleichmäßige Morphologie der Oberfläche der Gold-NP zu erreichen.

Um zu testen, wie die Gold-NP an dem DNA-Origami wachsen, wurde die (S)-Konfiguration in Kombination mit 40 nm und 80 nm Gold-NP verwendet.

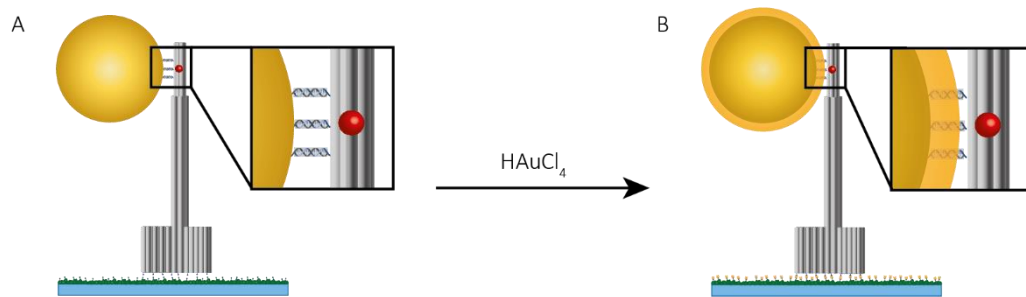


Abbildung 74: Schematische Darstellung des Wachstums der Gold-NP an der Nanoantenne.

Zunächst sollte getestet werden, ob die Mercaptobernsteinsäure oder die Goldsäure einen Einfluss auf den Farbstoff haben. Dafür wurde eine Oberfläche mit der Nanoantenne ohne Gold-NP hergestellt und mit dem Wachstums-Puffer (s. Anhang) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit dem Standardpuffer (1xPBS, 12 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM NaCl) gespült. Die Probe wurde sowohl vor als auch nach dem Wachstum mehrfach mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 75 dargestellt. Es ist zu sehen, dass weder die Fluoreszenz noch die Fluoreszenzlebensdauer sich ändert und auch die Farbstoffmenge gleichbleibt.

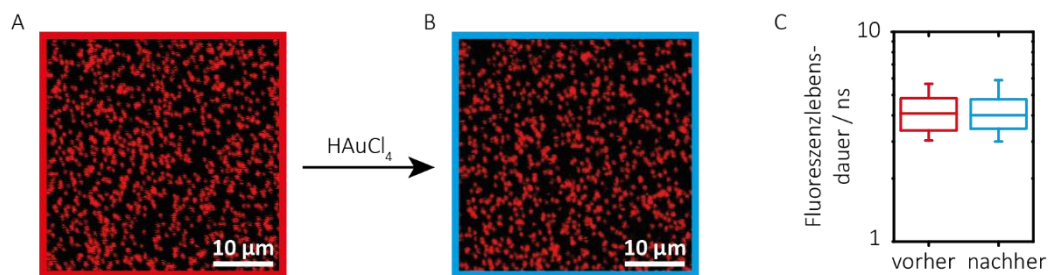


Abbildung 75: A) Fluoreszenzaufnahme der Nanoantennen vor Zugabe der Goldsäure/Mercaptobernsteinsäure. B) Fluoreszenzaufnahme der Nanoantennen nach der Zugabe. C) Fluoreszenzlebensdauer vor und nach der Zugabe der Goldsäure/Mercaptobernsteinsäure.

Als nächstes wurde das Wachstum der Gold-NP in Lösung mittels DLS (*dynamic light scattering*) überprüft (s. Abbildung 76 A). Es zeigt sich, dass das Wachstum sehr schnell erfolgt und zu einer Sättigung bei knapp unter einem Durchmesser von 60 nm kommt. Damit wuchsen die 40 nm großen Gold-NP in Lösung um annähernd 20 nm. Da bei der Nanoantenne aber bereits ein Abstand von 6,5 nm erreicht wird, würde ein solches Wachstum über den Farbstoff hinausgehen. Da allerdings kein Wachstum in Lösung durchgeführt werden sollte, sondern an Nanoantennen, die an Glas immobilisiert waren, kann davon ausgegangen werden, dass ein deutlich langsames Wachstum auftritt. Diese Annahme konnte mittels Dunkelfeldspektroskopie an Hand von 80 nm Gold-NP bestätigt werden (s. Abbildung 76 B).

Es wurden sowohl Nanoantennen mit 40 nm großen Gold-NP als auch 80 nm großen Gold-NP untersucht und in beiden Fällen das Wachstum nach einer Stunde abgebrochen. Die Proben wurden vorher und nachher sowohl mit dem Dunkelfeldmikroskop als auch mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Sowohl für die 40 nm Gold-NP, als auch die 80 nm Gold-NP konnte ein Wachstum anhand einer Rot-Verschiebung der Streuwellenlänge bestätigt werden (Abbildung 76 C, D). Die Verschiebung war hier allerdings deutlich größer für die 80 nm Gold-NP. Weiterhin konnte auch eine Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer und eine Zunahme der Fluoreszenzverstärkung verzeichnet werden (Abbildung 76 E, F).

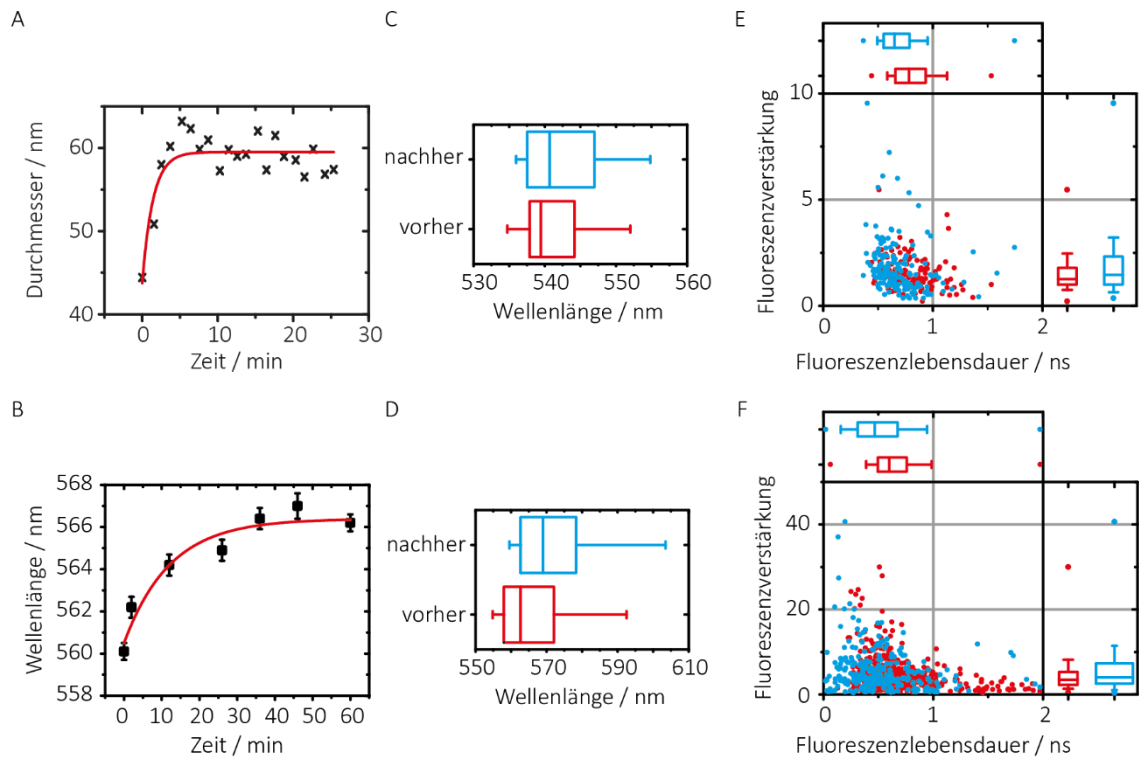


Abbildung 76: A) DLS-Messung des Wachstums der 40 nm Gold-NP in Lösung, B) Dunkelfeldmessung des Wachstums der 80 nm Gold-NP immobilisiert, C) Fluoreszenzverstärkung und Fluoreszenzlebensdauer vor dem Wachstum (rot) und danach (blau) der 40 nm Gold-NP und D) der 80 nm Gold-NP. E) Auftragung der Streuwellenlänge vor (rot) und nach dem Wachstum (blau) der 40 nm Gold-NP und F) der 80 nm Gold-NP.

Anhand dieser Messungen konnte also gezeigt werden, dass es möglich ist die Gold-NP wachsen zu lassen, nachdem diese bereits fest an ein DNA-Origami gebunden sind welches auf einer Glas-Oberfläche immobilisiert ist.

#### 4.3.2.5. Das rechteckige DNA-Origami als Nanoantenne

Anstelle des turmförmigen DNA-Origami kann auch ein zweidimensionales rechteckiges DNA-Origami (RO) verwendet werden, um zwei mNP zu binden. Das RO hat den Vorteil, dass es sich schneller assembliert (1 h anstelle von 24 h) und es nahezu keine Größenbegrenzung für mNP gibt. Außerdem wird keine BSA-Biotin-Oberfläche benötigt, da das RO elektrostatisch über die DNA an den mNP an die Glas-Oberfläche angebunden wird (siehe Abbildung 77 B). Die Synthese ist in Kapitel 3.3.4 beschrieben. Durch die elektrostatische Anbindung des RO über die mNP soll die parallele Ausrichtung der Nanoantenne zum elektrischen Feld des Anregungslichts gewährleistet sein. Ein weiterer Vorteil der elektrostatischen Anbindung und der Synthese in Lösung ist weiterhin, dass die Probe auch unter dem AFM betrachtet werden kann. In Abbildung 77 C ist die AFM-Aufnahme eines solchen Dimers mit 60 nm großen Gold-NP dargestellt. Durch diesen wurden zwei Querschnitte gelegt, um den Durchmesser zu bestimmen. Es wurden Histogramme erstellt und eine Gauß-Kurve über diese gelegt (siehe Abbildung 77 D). Die Breite auf halber Höhe (FWHM) gibt die Partikelgröße an. Die Breite der drei Gauß-Kurven beträgt etwa 66 nm und der Abstand zwischen den Erwartungswerten der roten und der orangenen Kurve 73 nm, welches einem Abstand von 7 nm zwischen den Gold-NP entspricht. Die verwendete Lösungssynthese wurde von der Arbeitsgruppe um Ilko Bald aus Potsdam übernommen [76].

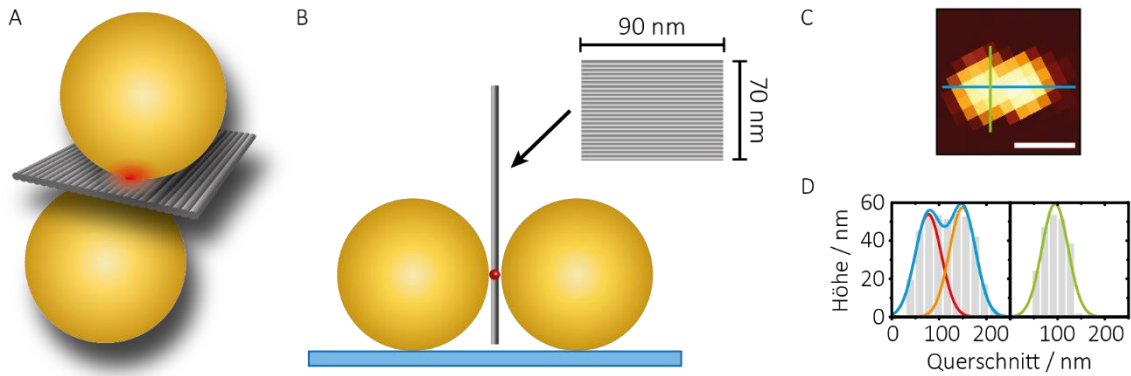


Abbildung 77: A) 3D-Darstellung des RO mit den beiden Gold-NP. B) Elektrostatische Anbindung der Gold-NP an Glas. C) AFM-Bild des Dimers. D) Histogramme über die Querschnitte.

Die mNP können sowohl in der Reißverschluss-Konfiguration (R), als auch in der Scheren-Konfiguration (S) angebunden werden. In der (R)-Konfiguration beträgt der Abstand zwischen dem Farbstoff und dem mNP etwa 3,75 nm. In der (S)-Konfiguration wird ein Abstand von 4,25 nm angenommen, entsprechend den Ergebnissen von Vietz et al. [74].

Zunächst sollte ein Vergleich zwischen dem RO und der Nanoantenne (NA) mit jeweils 60 nm Gold-NP durchgeführt werden. Da das rechteckige DNA-Origami einen geringeren Abstand zwischen dem Farbstoff und dem mNP erlaubt, wurden zunächst die zu erwartenden Ratenänderungen berechnet. Diese sind in Abbildung 78 für die (R)- und (S)-Konfiguration am RO und die (R)-Konfiguration an der NA dargestellt. Bei diesen kurzen Abständen kommt es bereits zu einer starken Verringerung der Quantenausbeute, die den verstärkenden Effekt der Anregungsratenänderung nahezu aufhebt. Dies zeigt sich in der Fluoreszenzverstärkung, die für einen Abstand von 6 nm immerhin noch über dem Faktor zwei liegt, jedoch bei einem Abstand von 3,75 nm kaum noch vorhanden ist. Aus diesem Grund wurde das RO in der (S)-Konfiguration anstelle der (R)-Konfiguration untersucht.

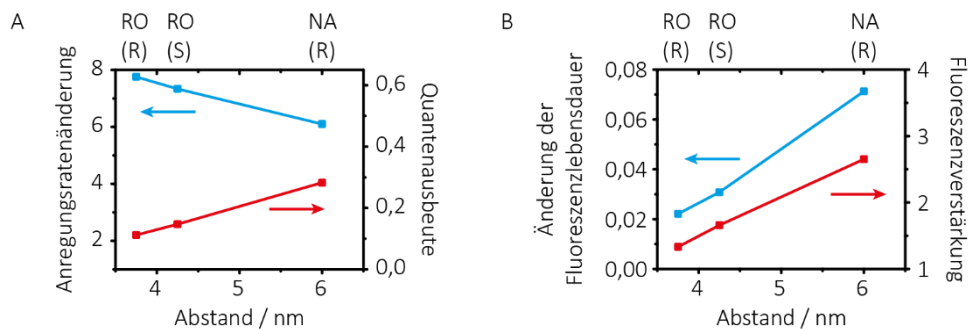


Abbildung 78: A) Änderung der Anregungsrate und der Quantenausbeute in Abhängigkeit von dem Abstand zwischen dem mNP und dem Farbstoff für die Nanoantenne (NA) und das rechteckige DNA-Origami (RO). B) Änderung der Fluoreszenzlebensdauer und der Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit vom Abstand in Abhängigkeit von dem Abstand zwischen dem mNP und dem Farbstoff für die Nanoantenne (NA) und das rechteckige DNA-Origami (RO).

In Abbildung 79 sind die Ergebnisse (nach allen oben genannten Korrekturen) der Experimente dargestellt. Zu beachten ist, dass bei der RO-Probe das Monomer keine feste Orientierung auf dem Glas hat und so eine breite Möglichkeit an Kopplungen zwischen dem Farbstoff und dem mNP zu erwarten sind. So kommt es zu einer breiten Verteilung an Fluoreszenzinten-

sitäten und Fluoreszenzlebensdauern. Die Fluoreszenzlebensdauer ist für die NA in der (R)-Konfiguration wie erwartet weniger stark verringert als für das RO in der (S)-Konfiguration. Auch die Fluoreszenzverstärkung (B) entspricht den Erwartungen. Die Streuwellenlänge (C) ist für beide Monomere ähnlich und auch der Streuquerschnitt (D) ist in etwa gleich. Interessant ist hier, dass die NA eine deutlich breitere Verteilung aufweist als das RO. Die mNP selbst waren bei allen Proben aus der gleichen Charge. Es muss also an dem DNA-Origami oder der Synthese der Nanoantennen selbst liegen, dass unterschiedlich breite Verteilungen vorkommen. Zum einen kann es bei der NA durch die lange Inkubationszeit mit den mNP dazu kommen, dass sich diese in unmittelbarer Umgebung der Nanoantenne an die Oberfläche legen und nicht fortgespült werden. Zum anderen können Nanopartikel-Aggregate an die NA anbinden. Diese beiden Schwachstellen entfallen bei der Lösungssynthese. Bei dieser werden durch die Gelelektrophorese Aggregate und mNP ohne DNA-Origami aus der Probe entfernt.

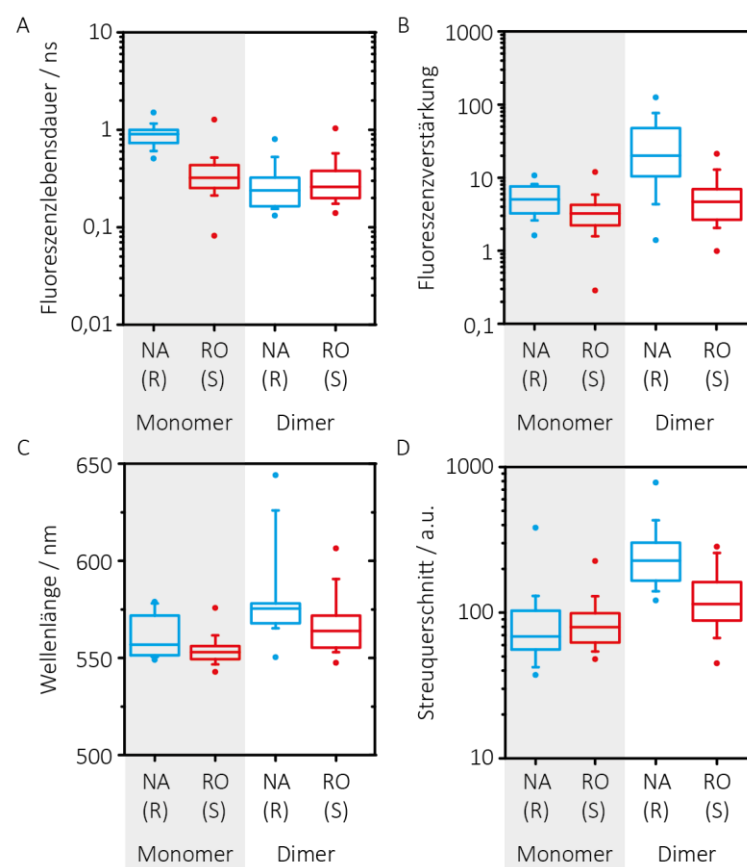


Abbildung 79: Vergleich der A) Fluoreszenzlebensdauern und der B) Fluoreszenzverstärkung, sowie der C) Streuwellenlängen und der D) Streuquerschnitte des Dimers mit dem Monomer für das RO und die NA. E) Streuquerschnitt des Dimers bei einem Abstand von 7 nm (RO) und 12 nm (NA).

Bei den Dimeren ist die Fluoreszenzlebensdauer von der NA und dem RO nahezu identisch. Interessant ist an dieser Stelle der Trend der Fluoreszenzverstärkung. Das RO in der (S)-Konfiguration erfährt kaum eine Fluoreszenzverstärkung gegenüber dem Monomer, während der NA-Dimer viel stärker fluoresziert. In Abbildung A 35 ist die Fluoreszenzverstärkung für jedes aufgenommene Molekül gegen die Fluoreszenzlebensdauer aufgetragen. Während bei der Nanoantenne eine deut-

liche Trennung sowohl in der Fluoreszenzverstärkung als auch in der Fluoreszenzlebensdauer zu erkennen ist, verschwimmen diese bei dem rechteckigen DNA-Origami. Die Fluoreszenzdaten korrelieren mit den gemessenen Streuwellenlängen und den Streuquerschnitten.

Bei allen Messungen ist zu beachten, dass das RO ein relativ flexibles DNA-Origami ist, dessen Form stark von der umgebenden Salzkonzentration abhängt [90]. In Abbildung 80 sind zwei mögliche Anordnungen des ROs beim Anbinden an Glas dargestellt. Abbildung 80 A stellt die beabsichtigte Form dar, bei der die Gold-NP und das Farbstoffmolekül in der Polarisationssebene des Anregungslichts liegen. Abbildung 80 B hingegen zeigt die Variante in der das RO sich zwischen dem Glas und dem Gold-NP befindet und so eine leichte Verschiebung der Ebene der Nanoantenne im Vergleich zur Polarisationssebene des Anregungslichts verursacht. Damit kann nicht mehr die maximale Kopplung zwischen dem Farbstoff und den Gold-NP erreicht werden und die Fluoreszenzverstärkung wird gleichermaßen niedriger.

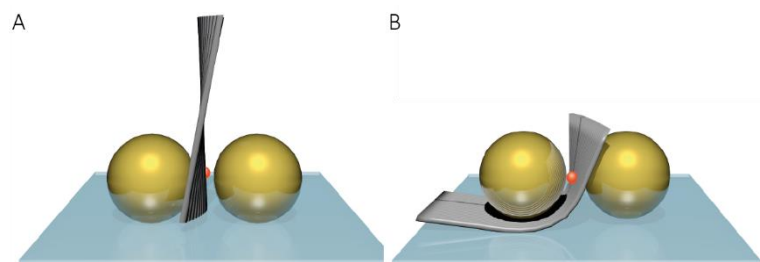


Abbildung 80: A und B) Schematische Darstellungen der beiden möglichen Anordnungen, in denen das RO mit den beiden Gold-NP elektrostatisch an Glas anbinden kann.

In Abbildung 81 A und B sind die Fluoreszenzlebensdauern für die aus der Dimer-Messung erhaltenen Monomere des RO in der (S)-Konfiguration mit 40 nm und 60 nm Gold-NP, sowie 60 nm Silber-NP dargestellt. Auch hier gilt weiterhin, dass das Monomer keine feste Orientierung auf dem Glas hat. Es ist zu sehen, dass die 60 nm großen Gold-NP zu einer stärkeren Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer führen als die 40 nm großen Gold-NP, während die 60 nm Silber-NP die geringste Fluoreszenzlebensdaueränderung haben. Die Fluoreszenzverstärkung korreliert mit der Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer. Sie ist am stärksten für 60 nm Gold-NP und am geringsten für 60 nm Silber-NP. In den beiden Graphen sind weiterhin die nach den Gleichungen (24)-(29) berechneten Fluoreszenzlebensdauern und Fluoreszenzverstärkungen für einen Abstand von 4,25 nm zwischen dem NP und dem Farbstoff dargestellt. Hier ist zu beachten, dass die Berechnungen von einem Idealfall ausgehen, bei dem die Farbstoffmoleküle in einer festen Orientierung zum mNP ausgerichtet sind und eine perfekte sphärische Kugel angenommen wird. Die große Abweichung in den Fluoreszenzlebensdauern kommen dadurch zustande, dass das Fluoreszenzmikroskop nur eine begrenzte zeitliche Auflösung hat. Der Trend stimmt aber trotzdem überein.

Für die Monomere aus 60 nm Gold-NP und 60 nm Silber-NP wurden ferner FDTD-Simulationen (engl. *finite difference time domain*) von Dr. Guillermo Acuna angefertigt (siehe Abbildung 81 C und D). Diese zeigen, dass Silber nur im blauen Bereich absorbiert, wohingegen Gold im grünen Bereich des elektromagnetischen Spektrums absorbiert und Silber auch insgesamt eine deutlich geringere Absorption als Gold zeigt. Dies bedeutet, dass das Farbstoffmolekül in der Nähe der 60 nm Gold-NP eine stärkere Verringerung der Quantenausbeute erfährt als bei den 60 nm Silber-NP (siehe Abbildung A 36). Dies stimmt mit der gemessenen geringeren Fluoreszenzlebensdauer von 60 nm Gold im Vergleich zu 60 nm Silber überein. Der Streuquerschnitt hingegen ist für Silber deutlich größer als der für Gold, liegt allerdings auch im blauen Bereich und somit weiter

entfernt vom Farbstoffspektrum. Dies hat zur Folge, dass die Erhöhung der Anregungsrate deutlich stärker für 60 nm Gold als für 60 nm Silber ausfällt (siehe Abbildung A 36). Die Kombination aus der Verringerung der Quantenausbeute und der Veränderung der Anregungsrate ergibt insgesamt eine größere Fluoreszenzverstärkung für 60 nm Silber-NP als für 60 nm Gold-NP. Dies ist allerdings nicht in den Messungen zu sehen. Die gemessenen Streuwellenlängen (Abbildung 81 E) liegen wie zu erwarten etwas rot-verschoben zu den simulierten Daten. Auch der Streuquerschnitt ist wie zu erwarten für 60 nm Silber-NP größer als für 60 nm Gold-NP und für 60 nm Gold-NP größer als für 40 nm Gold-NP. Die stärkere Fluoreszenzverstärkung für 60 nm Gold-NP liegt wiederum vermutlich darin begründet, dass die erworbenen Silber-NP deutlich heterogener in ihrer Form und Größe sind als die Gold-NP. Im Anhang ist eine Auswahl der gemessenen Streuspektren dargestellt (Abbildung A 37, Abbildung A 38, Abbildung A 39).

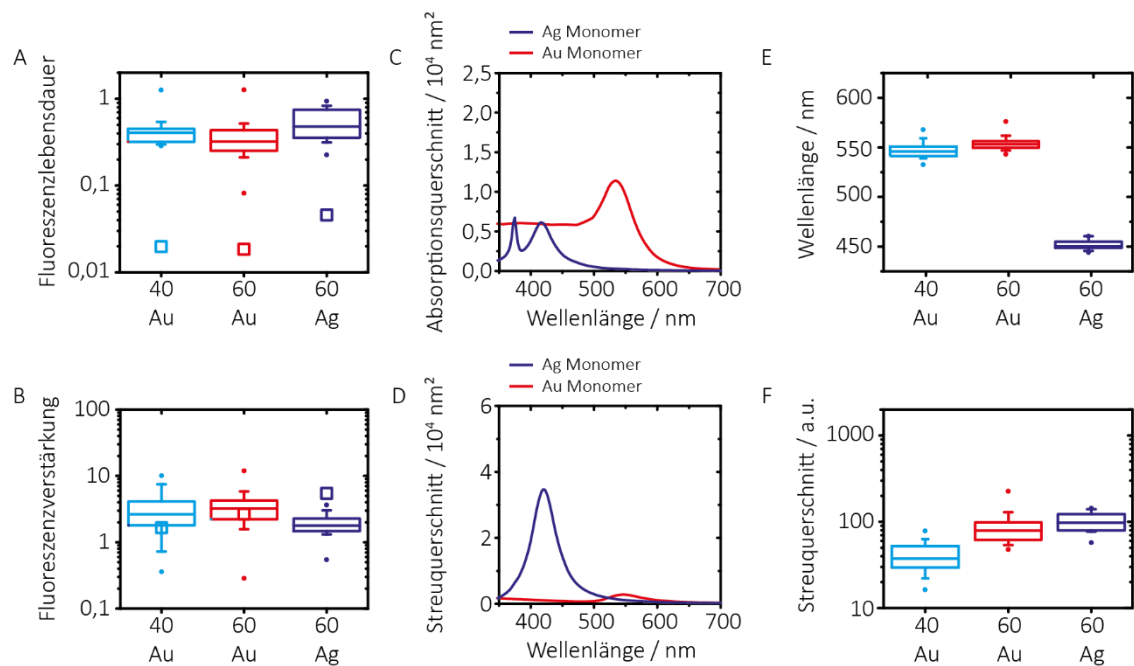


Abbildung 81: A) Fluoreszenzlebensdauer und B) Fluoreszenzverstärkung des Monomer für unterschiedliche mNP. Die Quadrate sind die nach Bharadwaj et al. [55] berechneten Werte. C) Simulierter Absorptionsquerschnitt für den Monomer aus 60 nm Silber-NP und 60 nm Gold-NP. D) Simulierter Streuquerschnitt des Monomer für unterschiedliche mNP. E) Streuwellenlänge des Monomer für unterschiedliche mNP. F) Streuquerschnitt des Monomer für unterschiedliche mNP.

In Abbildung 82 ist ein Vergleich zwischen den Monomeren und den Dimeren für die unterschiedlichen mNP dargestellt. Die Fluoreszenzlebensdauern verändern sich kaum während bei der Fluoreszenzverstärkung eine Vergrößerung vom Monomer zum Dimer zu beobachten ist. Während im Mittel die Fluoreszenzverstärkung für die 40 nm Gold-NP am stärksten ist, ist die maximal erreichte Fluoreszenzverstärkung bei 60 nm Silber-NP zu verzeichnen. Wird die Streuwellenlänge der Dimere betrachtet, so fällt auf, dass die Verteilung für 60 nm Silber-NP sehr breit ist. Dies liegt vermutlich daran, dass Silber-NP eine starke Inhomogenität bezüglich ihrer Größe und Form zeigen und eine kompliziertere Oberflächenchemie haben als Gold-NP. Die Streuquerschnitte nehmen wie erwartet im Vergleich zum Monomer zu und auch von 40 nm Gold- über 60 nm Gold- nach 60 nm Silber-NP. In Abbildung A 40, Abbildung A 41 und Abbildung A 42 sind die gemessenen Streuspektren für 40 nm Gold-NP-Dimere, 60 nm Gold-NP-Dimere und 60 nm Silber-NP-Dimere zu sehen. Während bei den 40 nm Gold-NP nur eine sehr geringe Polarisationsabhängigkeit zu messen ist, zeigen die 60 nm Gold- und Silber-NP eine stärkere Abhängigkeit. Es ist allerdings ferner auch zu sehen, dass bei den Silber-NP stärker von der Erwartung abweichende



Streuspektren aufgenommen werden als bei den Gold-NP. Während bei Gold nur eine stärkere Rot-Verschiebung auftritt, ändert sich bei Silber auch die Form der Streuspektren teilweise sehr stark. Dies liegt auch daran, dass zwei Silber-NP unterschiedlicher Form und Größe einen Dimer bilden können und dies bei Silber aufgrund der inhomogenen Probe deutlich wahrscheinlicher ist als bei Gold.

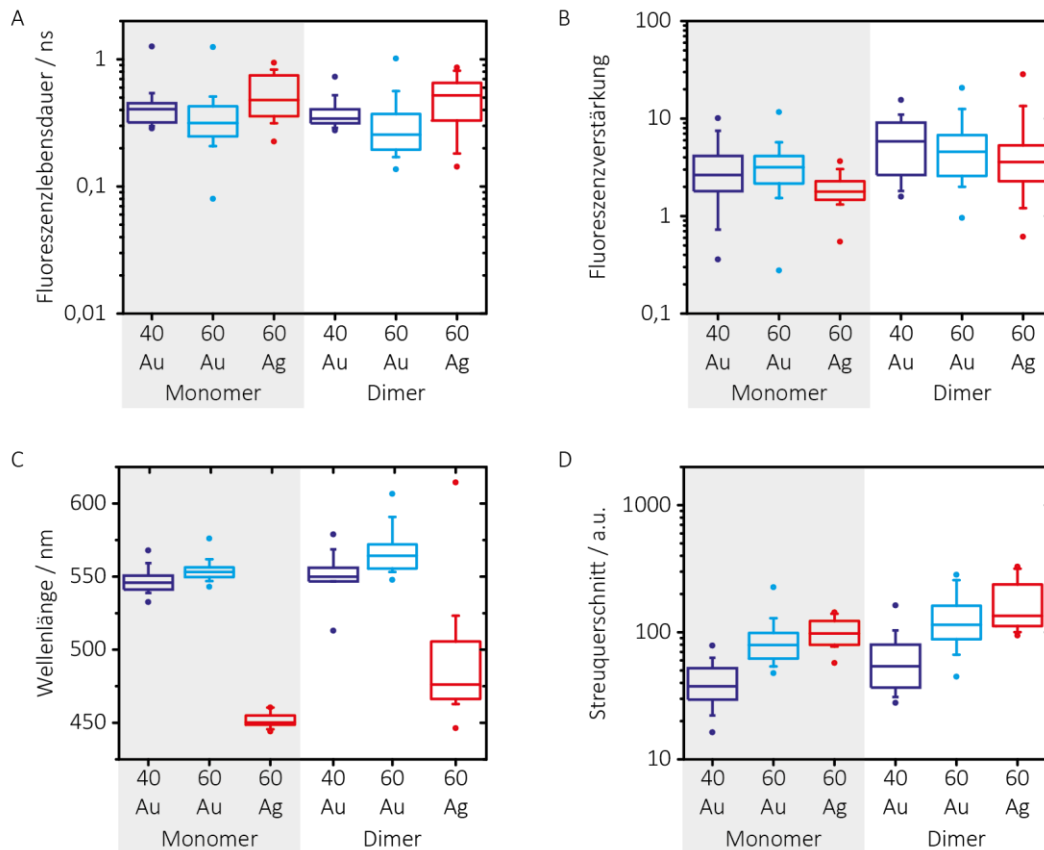


Abbildung 82: Vergleich der A) Fluoreszenzlebensdauern und der B) Fluoreszenzverstärkung, sowie der C) Streuwellenlängen und der D) Streuquerschnitte des Dimers mit dem Monomer für unterschiedliche mNP.

In Abbildung 83 sind die Absorptionsquerschnitte und Streuquerschnitte für 60 nm Silber-NP und 60 nm Gold-NP Dimere dargestellt. Dort ist zu sehen, dass der Absorptionsquerschnitt für Gold-Dimere deutlich größer ist als für Silber-Dimere, wohingegen der Streuquerschnitt bei den Silber-Dimeren deutlich größer als bei den Gold-Dimeren ist. Da bei den Dimeren im Vergleich zu den Monomeren auch eine Rot-Verschiebung auftritt, kommt es zu einer verbesserten Kopplung zwischen dem Farbstoff und dem mNP. Während sich bei Gold der Streuquerschnitt von 545 nm nur auf 620 nm verschiebt, erreicht Silber eine Verschiebung von 445 nm bis zu 530 nm. Ebenso ist der Streuquerschnitt von Silber dreimal größer als der von Gold. Demgegenüber sind die Absorptionswellenlänge und der Absorptionsquerschnitt nur wenig verändert im Vergleich zum Monomer.



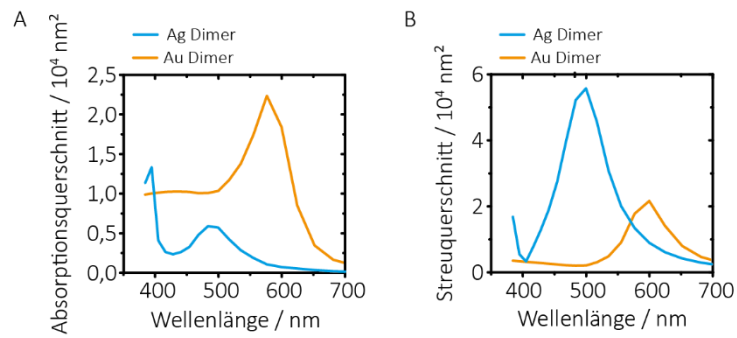


Abbildung 83: A) Absorptionsspektren von einem Dimer aus je zwei 60 nm Silber-NP und zwei 60 nm Gold-NP. B) Streuspektren von einem Dimer aus je zwei 60 nm Silber-NP und zwei 60 nm Gold-NP.

Es konnte in diesem Teil der Arbeit also gezeigt werden, dass ein DNA-Origami als Baustein verwendet werden kann, um die mNP und den Farbstoff anzuordnen und das Ganze in Lösung zu synthetisieren. Dies ermöglicht eine größere Anwendungsvielfalt als die Anbindung der mNP an immobilisierten DNA-Origami. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, eine Nanoantenne über die mNP an Glas zu binden, um so Probleme durch die Immobilisierung über Biotin-Neutravidin zu umgehen.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1. DNA-Origami basierte molekulare Kraftklammer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kraftspektroskopische Messungen in Form von Einzelmolekül-FRET-Mikroskopie durchgeführt. Dabei wurde ein dreidimensionales DNA-Origami verwendet, die sogenannte molekulare Kraftklammer, die unterschiedliche, zuvor berechnete Kräfte auf ein Biomolekül ausüben konnte. Zur Überprüfung des Systems wurde zunächst die Holliday Junction (HJ), ein gut untersuchtes Biomolekül, in der Kraftklammer eingespannt und anhand des FRET-Wertes der beiden an die HJ angebondenen Farbstoffmoleküle das Besetzungsverhältnis der beiden Konformationen der HJ in Abhängigkeit von der angelegten Kraft untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen von der Arbeitsgruppe von T. J. Ha verglichen und eine Übereinstimmung belegt. Somit konnte die akkurate Funktionsweise der Kraftklammer bewiesen werden. Im nächsten Schritt wurde die Wechselwirkung zwischen dem TATA-Box-bindenden Protein (TBP) mit doppelsträngiger DNA unter Einwirken einer Kraft untersucht. Dies waren die ersten quantitativen kraftspektroskopischen Untersuchungen an TBP. Es konnte in dieser Arbeit also gezeigt werden, dass die molekulare Kraftklammer ein nützliches neues Instrument ist, um einfach, schnell und kostengünstig die Auswirkung von Kräften auf Biomolekülen in einem Bereich von 0 pN bis hin zu ~50 pN zu untersuchen.

In Zukunft können die molekularen Kraftklammern verwendet werden, um weitere Biomoleküle, wie beispielsweise eukaryotisches TBP oder andere mit DNA wechselwirkende bzw. durch DNA modifizierbare Biomoleküle zu untersuchen. Des Weiteren könnte die Holliday Junction als direkte Referenz in die Kraftklammer eingebaut werden, um an ihr die Auswirkungen der Kraft zu messen und so nicht das Biomolekül markieren zu müssen. Ferner gibt es die Idee, durch ein Verlängern des doppelsträngigen Bereiches innerhalb der Kraftklammer, durch das Hinzufügen von einzelsträngiger DNA, die Kraft an einer einzelnen Kraftklammer zu variieren, so dass kein Bedarf an dem Falten mehrerer Kraftklammern mit unterschiedlichen Kräften mehr besteht.

### 5.2. DNA-Origami Lichtsammelkomplex

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass um ein Akzeptormolekül ringförmig angeordnete Donormoleküle als ein Lichtsammelkomplex fungieren können. Dafür wurde ein rechteckiges DNA-Origami verwendet, welches es ermöglicht, in definierten Abständen von 5,2 nm und 5,6 nm den Donor- zum Akzeptormolekül zu positionieren. Aufgrund der Möglichkeit die Anzahl der Donormoleküle (1 bis 6) zu variieren konnte der Antenneneffekt in Abhängigkeit des Abstands zwischen Donor- und Akzeptormolekül, sowie von der Anzahl an Donormolekülen ermittelt werden. Wie erwartet steigt der Antenneneffekt mit der Anzahl an Donormolekülen linear an, sowie er mit steigendem Donor-Akzeptor-Abstand sinkt. Dies zeigt, dass sich das DNA-Origami als Plattform zur Herstellung von synthetischen Antennen eignet. Durch Betrachten der Stöchiometrie-Werte, die sehr homogen und relativ schmal sind, konnte gezeigt werden, dass die Proben selbst auch sehr homogen sind, was auf ein gut definiertes Donor-Akzeptor-Verhältnis schließen lässt. Dies bedeutet, dass das DNA-Origami ein zuverlässiges System ist, dass sich eignet, um synthetische Antennen mit einfachen Mitteln (Fluoreszenzspektrometer) zu untersuchen. Durch die vielen möglichen Modifikationen des DNA-Origamis ist es möglich diverse Konfigurationen und Zusammenstellungen von Farbstoffmolekülen zu überprüfen, um einen optimalen Energietransfer zu erreichen.

Ferner können natürlich vorkommende Lichtsammelkomplexe nachgestellt und auf ihre Funktion und Effizienz so indirekt untersucht werden.

### 5.3. DNA-Origami Nanoantennen

In dem letzten Teil dieser Arbeit, der zugleich auch den Schwerpunkt darstellt, wurde die Fluoreszenz von Farbstoffmolekülen mit der Streuung von benachbarten ( $<10$  nm) mNP korreliert. So konnte die Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer und der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der mNP-Größe und dem Material mit der Streuwellenlänge und dem Streuquerschnitt verglichen werden. Um solche Messungen durchführen zu können, musste zunächst ein konfokales Fluoreszenzmikroskop um ein hyperspektrales Dunkelfeldmikroskop erweitert werden. Dies beinhaltete nicht nur den Aufbau der Geräte und der Hardware, sondern auch die Erstellung neuer Programme in LabVIEW, die für die Auswertung der Daten der Dunkelfeldmessungen nötig waren, sowie auch für die Korrelation mit den Daten aus den Fluoreszenzmessungen. Weiterhin musste eine Methode entwickelt werden, mit der die untersuchten Moleküle einer Probe anhand der Streuspektren nach Monomeren und Dimeren sortiert werden können. Bereits bei der Untersuchung der Monomer-Proben zeigte sich, dass Nanoantennen vorkommen, deren Streuspektren nicht denen eines sphärischen mNP entsprechen, in erster Linie bedingt durch die Heterogenität der mNP (Größe und Form) und der nicht-idealen Bindung dieser an das DNA-Origami. Dies wurde in die Entwicklung der Methode zur Auswertung der Proben mit einbezogen, sodass anhand der Streuspektren eine Sortierung in sphärische mNP und andere getroffen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte so gezeigt werden, dass es möglich ist, mit einem kombinierten Fluoreszenz- und Dunkelfeldmikroskop DNA-Origami Nanoantennen unterschiedlicher Zusammensetzung zu charakterisieren, Monomere von Dimeren zu unterscheiden und das chemische Wachstum von mNP an DNA-Origami zu beobachten. Aufgrund der starken Heterogenität der mNP, aber auch der Probe selbst ist die Kombination mit Dunkelfeldmessungen essentiell wichtig, um untersuchen zu können welche Einflussfaktoren sich wie stark auf das Fluoreszenzverhalten des Farbstoffmoleküls auswirken. Die hier beschriebenen Messungen zeigen deutlich, dass die Heterogenität der mNP sowie auch die Orientierung des DNA-Origamis auf der Glasoberfläche einen großen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse haben. Ein Ansatz diese Probleme zu lösen besteht aus der Verwendung der neu entwickelten, ultrasphärischen mNP, die so ein Hauptproblem der Plasmonik lösen könnten. Des Weiteren wurde ein anderes DNA-Origami und eine gänzlich andere Synthesemethode verwendet, um das Orientierungsproblem zu lösen.

Der zweite Teil der kombinierten Dunkelfeld-Fluoreszenz-Messungen beschäftigte sich mit der Lösungs-Synthese von Nanoantennen mit einem rechteckigen DNA-Origami als Verbindungsstück. Dieses ist deutlich schmäler als das turmförmige DNA-Origami und ermöglicht so eine stärkere Wechselwirkung zwischen den mNP und dem Farbstoff. Allerdings zeigte sich in den Messungen, dass das rechteckige DNA-Origami sehr flexibel und der Abstand zwischen den mNP und dem Farbstoff zu gering ist, sodass es zu einer erhöhten Fluoreszenzlöschung kam. Als Alternative für die Zukunft soll daher ein zwei- bis dreilagiges DNA-Origami verwendet werden. Dieses garantiert eine höhere Stabilität sowie einen optimalen Abstand zwischen Farbstoff und mNP.

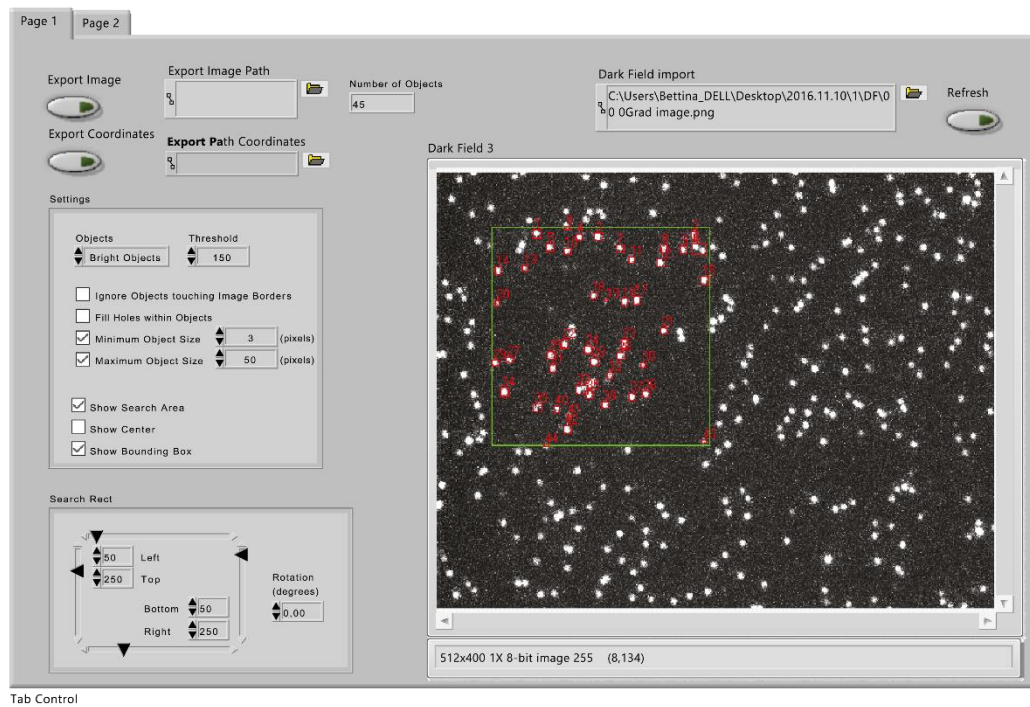
Wie im Rahmen dieser Arbeit ausgiebig gezeigt wurde, eignen sich DNA-Origami Nanoantennen als hervorragende Werkzeuge für die Untersuchung verschiedenster Biomoleküle auf Einzelmolekülebene. Aufgrund ihrer Fluoreszenzverstärkung

und der Verringerung des Anregungsvolumens wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis so entscheidend verbessert, dass es möglich ist Einzelmolekülmessungen bei hohen Konzentrationen durchzuführen. Im Gegensatz zu konventionellen plasmonischen Nanostrukturen, die z.B. lithographisch hergestellt werden, zeichnen sich DNA-Origami Nanoantennen durch eine kostengünstige, schnelle und parallele Synthese aus, die mit einem geringen technischen Aufwand durchführbar ist. Die DNA-Origami Nanoantennen eröffnen neue Wege für innovative biologische und klinische Anwendungen, wie beispielsweise der molekularen Diagnostik und der DNA-Sequenzierung.

Um in Zukunft einen hohen Automatisierungsgrad der Messungen zu erreichen, sind weitere Optimierungen der DNA-Origami Nanoantennen nötig. Dafür ist ein noch tieferes und besseres Verständnis der Wechselwirkungen zwischen den mNP und den Farbstoffmolekülen erforderlich. Dieses wird durch die in dieser Arbeit entwickelte Methode der Korrelation zwischen der Fluoreszenz und den Streuspektren jeder einzelnen DNA-Origami Nanoantenne ermöglicht.

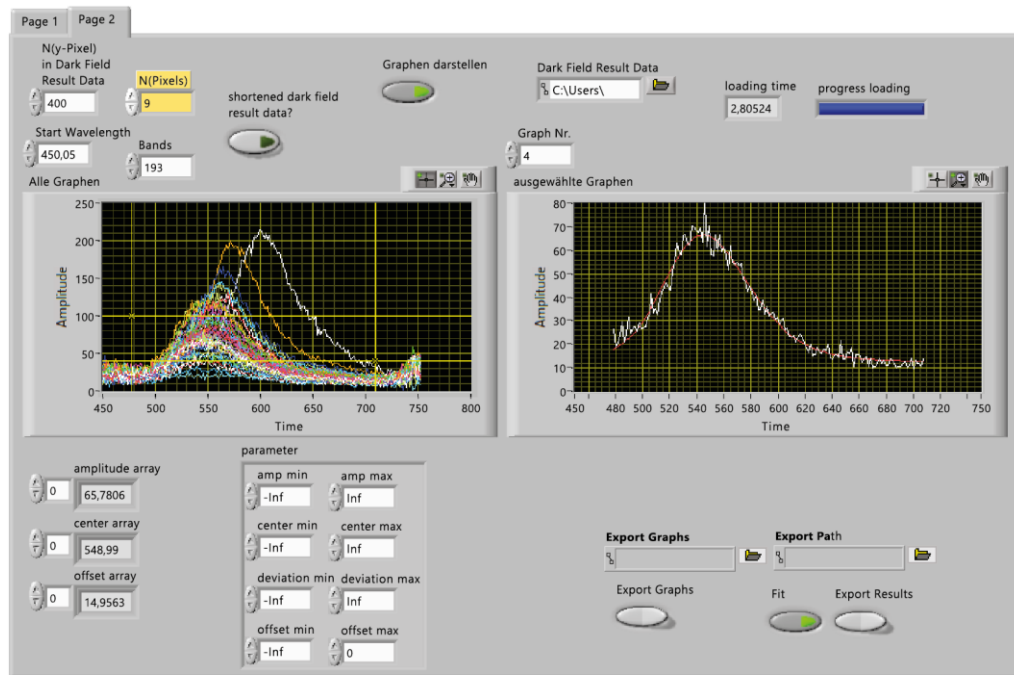
## 6. Anhang

### 6.1. LabVIEW Programme



Tab Control

Abbildung A 1: Auswertung der Dunkelfeldspektren in DF\_Wavelength\_Analysis.vi.



Tab Control

Abbildung A 2: Auswertung der Dunkelfeldspektren in DF\_Wavelength\_Analysis.vi.



Abbildung A 3: Auswertung mehrerer Aufnahmen einer Oberfläche in DF\_Wavelength\_Analysis\_Overlay.vi. Einladen der Koordinaten und des zugehörigen Bildes.

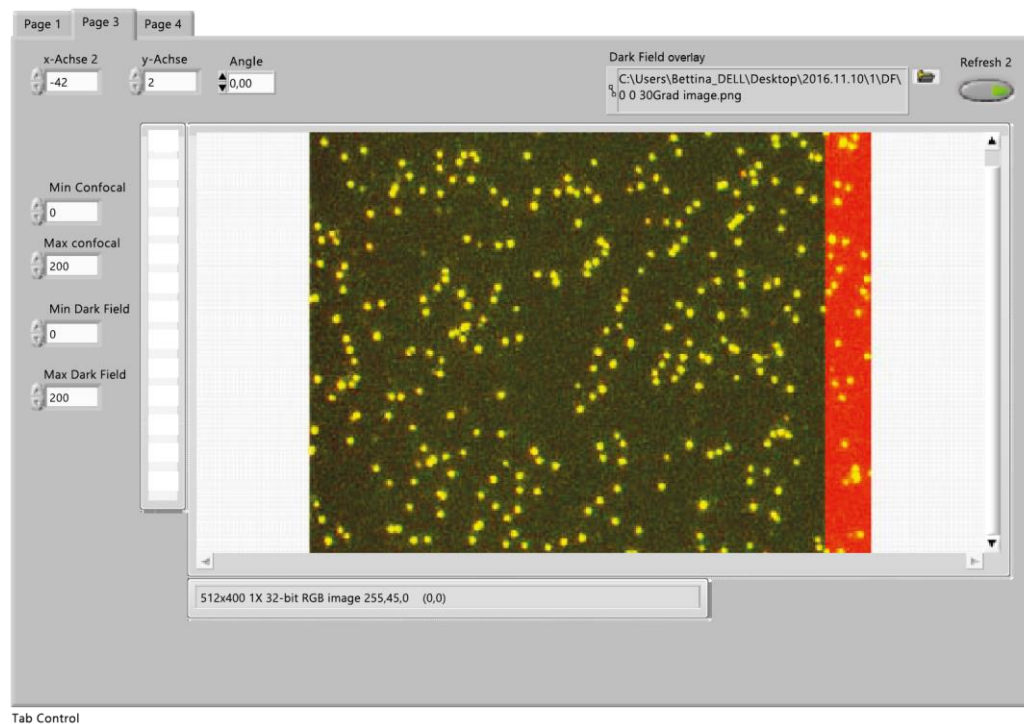


Abbildung A 4: Auswertung mehrerer Aufnahmen einer Oberfläche in DF\_Wavelength\_Analysis\_Overlay.vi. Einladen des Bildes, dessen Spektren bestimmt werden sollen und übereinander legen der beiden Bilder.



Abbildung A 5: Auswertung der kombinierten Dunkelfeld- und konfokalen Messung in DF\_CF\_Analysis.vi. Einladen des Dunkelfeld- und konfokalen Bildes.

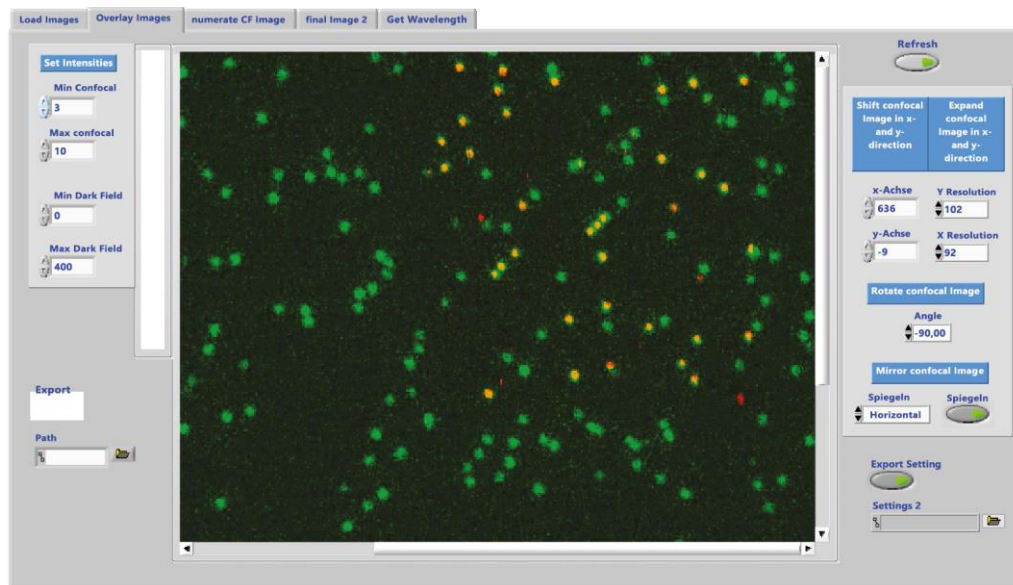


Abbildung A 6: Auswertung der kombinierten Dunkelfeld- und konfokalen Messung in DF\_CF\_Analysis.vi. Überinandernlegen der beiden Bilder.





Abbildung A 7: Auswertung der kombinierten Dunkelfeld- und konfokalen Messung in DF\_CF\_Analysis.vi. Nummerieren des konfokalen Bildes.

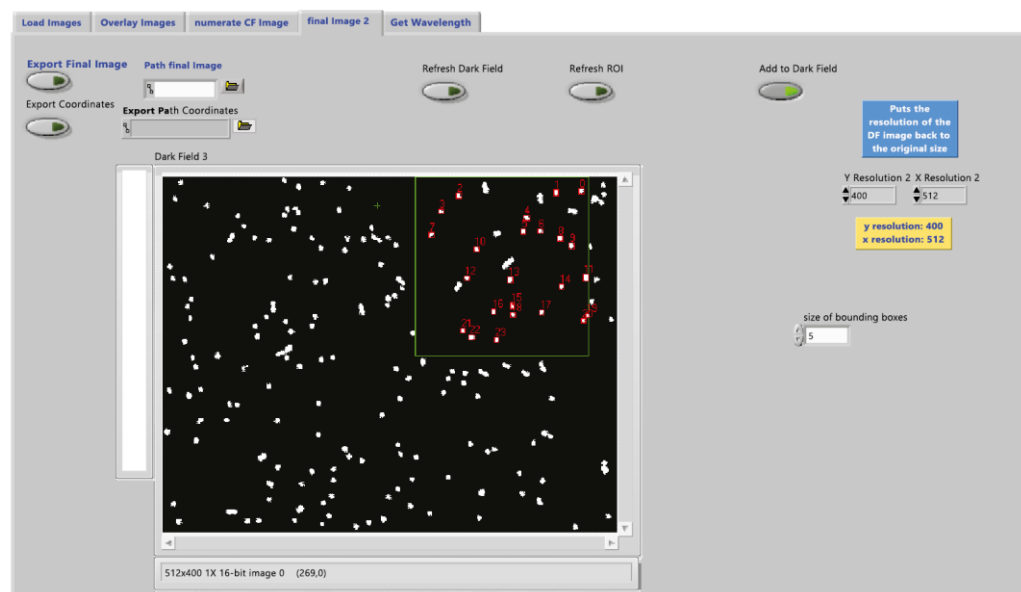


Abbildung A 8: Auswertung der kombinierten Dunkelfeld- und konfokalen Messung in DF\_CF\_Analysis.vi. Suchen der Spots im Dunkelfeld-Bild.



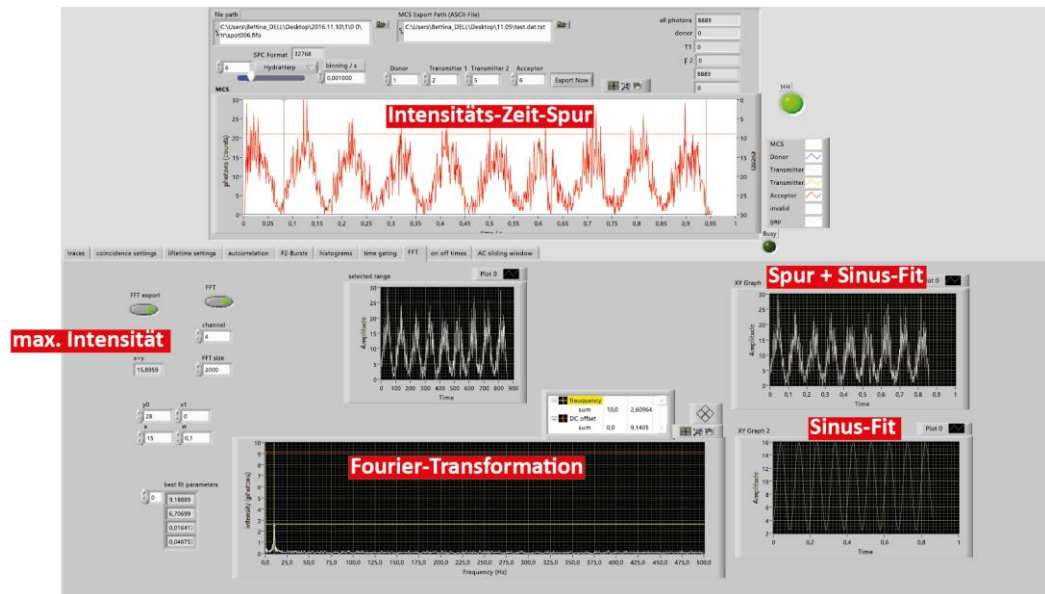


Abbildung A 9: Auswertung der modulierten Spuren in FiFoScreeBurst.vi mit Fourier-Transformation und Sinus-Fit.

## 6.2. Filter und Spiegel

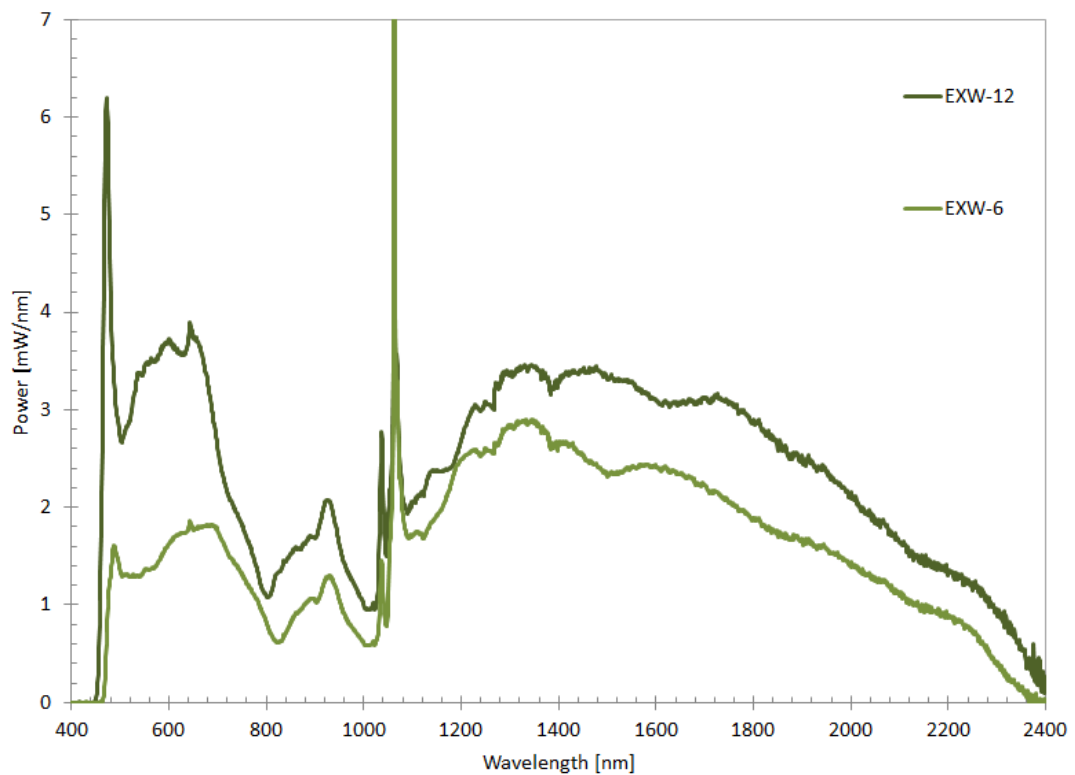


Abbildung A 10 Spektrum des Weißlichtlasers

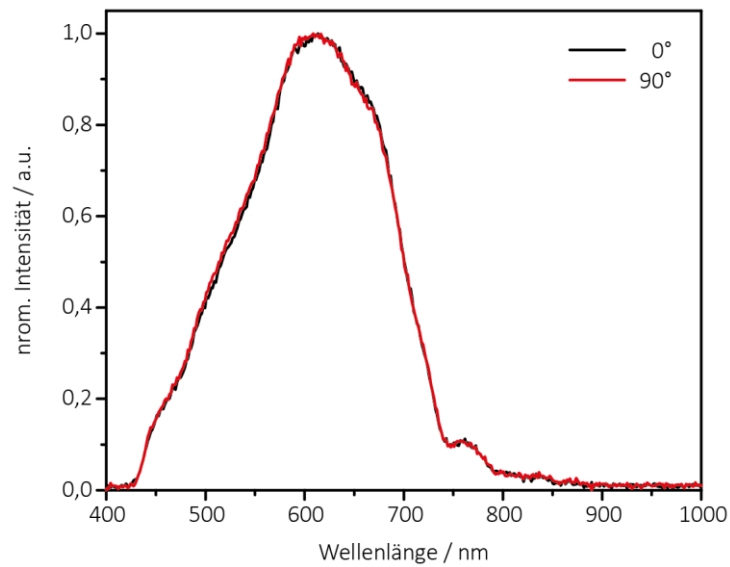


Abbildung A 11 Spektrum der Dunkelfeldlampe

### 6.3. Chemikalienliste

Substanz	Hersteller
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
P8584 (Potassium Phosphate Dibasic solution, 1 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
P8709 (Potassium Phosphat Monobasic solution, 1 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Tabletten)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glukose-Oxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Katalase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Goldsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Mercaptobernsteinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natronlauge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

## 6.4. Puffer

### TAE-Puffer: (TRIS-Acetat-EDTA) Gesamtvolumen 1 l

242 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

57,1 ml Acetat

100 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 500 mM, pH 8,0)

Mit Milli-Q Wasser auf 1 L auffüllen.

### PBS10:

10 mM NaCl

2,11 mM P8709

2,89 mM P8584

0,01% Tween20

1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 500 mM, pH 8,0)

1x PBS

### Wachstums-Puffer

80  $\mu$ M Goldsäure ( $\text{HAuCl}_4$ )

11,4  $\mu$ M Mercaptobornsteinsäure (2-Mercaptosuccinic Acid)

In Milli-Q lösen. Mit NaOH auf pH 6 einstellen.

Die Konzentration der Goldsäure ist abhängig von der Konzentration der Gold-NP und dem Anfangsradius und dem angestrebten End-Radius der Gold-NP:

$$[\text{HAuCl}_4] = [\text{AuNP}] * \left( \left( \frac{R_{\text{Ende}}}{R_{\text{Anfang}}} \right)^3 - 1 \right) \quad (60)$$

### 6.5. DNA-Origami Rezept für das modifizierte rechteckige DNA-Origami

Sequenz	Länge	Modifikation
ACATAACGGGAATCGTCATAAAATAAGCAAAG	32	
TTAACGTCTAACATAAAAAACAGGTAAACGGA	30	
ATTTTAAAATCAAAATTATTTGCACGGATTCTG	32	
TTAAAGCCAGAGCCGCCACCCTCGACAGAA	30	
AACAAGAGGGATAAAAAATTTTAGCATAAAGC	32	
GACCAACTAATGCCACTACGAAGGGGGTAGCA	32	
TTTCGGAAGTGCCGTCGAGAGGGTGAGTTTCG	32	
TCGAATTCGGGAAACCTGTCGTGCAGCTGATT	32	
ATACCCAACAGTATGTTAGCAAATTAGAGC	30	
TTAACACCAGCACTAACAACTAATCGTTATTA	32	
GTATAGCAAACAGTTAATGCCCAATCCTCA	30	
AGGCTCCAGAGGCTTTGAGGACACGGGTAA	30	
TAAGAGCAAATGTTTAGACTGGATAGGAAGCC	32	
AAACAGCTTTTTGCGGGATCGTCAACTAAA	32	
GTTTATCAATATGCGTTATACAAACCGACCGT	32	
GCCAGTTAGAGGGTAATTGAGCGCTTTAAGAA	32	
TTAATGAACTAGAGGATCCCCGGGGGGTAACG	32	
CTACCATAGTTTGAGTAACATTTAAATAT	30	
AGGCAAAGGGAAGGGCGATCGGCAATTCCA	30	
AATACTGCCAAAAGGAATTACGTGGCTCA	30	
TTAGACGGCCAAATAAGAAACGATAGAAGGCT	32	
TATATTTTGTCAATGCCTGAGAGTGGAAGATT	32	
AATAGCTATCAATAGAAAATTCAACATTCA	30	
TCTTCGCTGCACCGCTTCTGGTGCGGCCTTCC	32	
CTCGTATTAGAAATTGCGTAGATACAGTAC	30	
TCATCGCCAACAAAGTACAACGGACGCCAGCA	32	
ATTACCTTTGAATAAGGCTTGCCCAATCCGC	32	
CGTTTTCAAGGGAGGGAAGGTAAAGTTTATTT	32	
AGTATAAAGTTCAGCTAATGCAGATGTCTTTC	32	
GTGATAAAAAGACGCTGAGAAGAGATAACCTT	32	
TACGTTAAAGTAATCTTGACAAGAACCGAACT	32	
AGGAACCCATGTACCGTAACACTTGATATAA	31	
TTTTCACTCAAAGGGCGAAAAACCATCACC	30	
GCGAACCTCCAAGAACGGGTATGACAATAA	30	
ATATTCGGAACCATCGCCACGCAGAGAAGGA	32	

AGAAAACAAAGAAGATGATGAAACAGGCTGCG	32	
GCCCTTCAGAGTCCACTATTAAGGGTGCCGT	32	
AGAAAGGAACAACAAAGGAATTCAAAAAA	31	
ATCCCCCTATACCACATTCACTAGAAAAATC	32	
AGCGCGATGATAAATTGTGTCGTGACGAGA	30	
ATACATACCGAGGAAACGCAATAAGAAGCGCA	32	
TGGAACAACCGCCTGGCCCTGAGGCCCGCT	30	
GTAAAGTAATCGCCATATTTAACAAAACTTT	32	
CTGTAGCTTGACTATTATAGTCAGTTCATTGA	32	
TTTTATTTAAGCAAATCAGATATTTTTTGT	30	
GCGGAACATCTGAATAATGGAAGGTACAAAAT	32	
GATGTGCTTCAGGAAGATCGCACAATGTGA	30	
AAGGCCGCTGATACCGATAGTTGCGACGTTAG	32	
AACGCAAAGATAGCCGAACAAACCCTGAAC	30	
GACCTGCTCTTTGACCCCGAGCGAGGGAGTTA	32	
TTCTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACCGCGC	32	
ATCGCAAGTATGTAAATGCTGATGATAGGAAC	32	
CTGAGCAAAAATTAATTACATTTTGGGTGA	30	
TGACAACCTCGCTGAGGCTTGCAATTATACCA	30	
ATTATACTAAGAAACCACCAGAAGTCAACAGT	32	
ACCTTGCTTGGTCAGTTGGCAAAGAGCGGA	30	
TGTAGCCATTAATAATTCGATTAAATGCCGGA	32	
GCGGATAACCTATTATTCTGAAACAGACGATT	32	
ATTTACCGGGAACCAGAGCCACCACTGTAGCG	32	
ACGGCTACAAAAGGAGCCTTTAATGTGAGAAT	32	
CCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAAAGAATA	32	
GCAATTCACATATTCCTGATTATCAAAGTGTA	32	
GATGGTTTGAACGAGTAGTAAATTTACCATTA	32	
CACAACAGGTGCCTAATGAGTGCCAGCAG	30	
AATACGTTTGAAAGAGGACAGACTGACCTT	30	
GCACAGACAATATTTTTGAATGGGGTCAGTA	31	
TTTGGGGATAGTAGTAGCATTAAAAGGCCG	30	
ACCTTTTTATTTTAGTTAATTTATAGGGCTT	32	
TTTAGGACAAATGCTTTAAACAATCAGGTC	30	
GTATAAGCCAACCCGTCGGATTCTGACGACAG	32	
TAAATGAATTTTCTGTATGGGATTAATTTCTT	32	
TAAATCAAAATAATTCGCGTCTCGGAAACC	30	
TCAAATATAACCTCCGGCTTAGGTAACAATTT	32	

CCAATAGCTCATCGTAGGAATCATGGCATCAA	32	
AACACCAAATTTCAACTTTAATCGTTTACC	30	
GTACCGCAATTCTAAGAACGCGAGTATTATT	32	
CGATAGCATTGAGCCATTTGGGAACGTAGAAA	32	
AGACGACAAAAGAAGTTTGGCATAATTGCA	30	
TCAAGTTTCATTAAAGGTGAATATAAAAGA	30	
TTGACAGGCCACCACCAGAGCCGCGATTTGTA	32	
CATCAAGTAAACGAACTAACGAGTTGAGA	30	
GCCCGAGAGTCCACGCTGGTTTGAGCTAACT	32	
GCCTTAAACCAATCAATAATCGGCACGCGCCT	32	
CATAAATCTTTGAATACCAAGTGTTAGAAC	30	
ACAACTTTCAACAGTTTCAGCGGATGTATCGG	32	
AAAGTCACAAAATAAACAGCCAGCGTTTAA	30	
GTAATAAGTTAGGCAGAGGCATTTATGATATT	32	
TCACCGACGCACCGTAATCAGTAGCAGAACCG	32	
GCCATCAAGCTCATTTTTTAACCACAAATCCA	32	
CAGCAAAAGGAAACGTACCAATGAGCCGC	30	
TGAAAGGAGCAAATGAAAAATCTAGAGATAGA	32	
TTAGTATCACAATAGATAAGTCCACGAGCA	30	
CAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAAACGTGGA	31	
GCTTCTGTTCTGGGAGAAACAATAACGTAAAC	32	
AAGGAAACATAAAGGTGGCAACATTATCACCG	32	
GCTTTCCGATTACGCCAGCTGGCGGCTGTTTC	32	
TGTAGAAATCAAGATTAGTTGCTCTTACCA	30	
CTTTTGCAGATAAAAACCAAAATAAAGACTCC	32	
CAACCGTTTCAAATCACCATCAATTCGAGCCA	32	
CTCCAACGCAGTGAGACGGGCAACCAGCTGCA	32	
CAGGAGGTGGGGTCAGTGCCTTGAGTCTCTGA	32	
TTATACCACCAAATCAACGTAACGAACGAG	30	
TTTATCAGGACAGCATCGGAACGACACCAACC	32	
TAGGTAACTATTTTTGAGAGATCAAACGTTA	32	
CCACCTCTATTTCACAAACAAATACCTGCCTA	32	
TATAACTAACAAAGAACGCGAGAACGCCAA	30	
GCGAGTAAAAATATTTAAATTGTTACAAAG	30	
GCTTCAATCAGGATTAGAGAGTTATTTTCA	30	
TAAACGAGGTCAATCATAAGGGAACCGGATA	32	
TCACCACTACAACTACAACGCCTAGTACCAG	32	
TAATCAGCGGATTGACCGTAATCGTAACCG	30	

CTGTGTGATTGCGTTGCGCTCACTAGAGTTGC	32	
GAATTTATTTAATGGTTTGAAATATTCTTACC	32	
AATAGTAAACACTATCATAACCCCTATTGTGA	32	
CCACCCTCATTTTCAGGGATAGCAACCGTACT	32	
TCATTCAGATGCGATTTTAAGAACAGGCATAG	32	
TTCATTACGTCAGGACGTTGGGAAATGCAGAT	32	
TTCCAGTCGTAATCATGGTCATAAAAGGGG	30	
CATGTAATAGAATATAAAGTACCAAGCCGT	30	
GCCGTCAAAAACAGAGGTGAGGCCTATTAGT	32	
AGAAATAAAAAATCCTTTGCCCGAAAGATTAGA	32	
TAAATCGGGATTCCCAATTCTGCGATATAATG	32	
CCAGGGTTGCCAGTTTGAGGGGACCCGTGGGA	32	
GCCTCCCTCAGAATGGAAAGCGCAGTAACAGT	32	
ACAACATGCCAACGCTCAACAGTCTTCTGA	30	
TTATTACGAAGAACTGGCATGATTGCGAGAGG	32	
TTTACCCCAACATGTTTTAAATTTCCATAT	30	
AACGCAAAATCGATGAACGGTACCGGTTGA	30	
ACAAACGGAAAAGCCCCAAAAACACTGGAGCA	32	
CATTTGAAGGCGAATTATTCATTTTTGTTTGG	32	
TATCGGCCCGCAAGGCGATTAAGTTTACCGAGC	32	
CACCAGAAAGGTTGAGGCAGGTCATGAAAG	30	
AAAGCACTAAATCGGAACCTAATCCAGTT	30	
TTAGGATTGGCTGAGACTCCTCAATAACCGAT	32	
CTTTTACAAAATCGTCGCTATTAGCGATAG	30	
AGAGAGAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAT	32	
TATTAAGAAGCGGGGTTTTGCTCGTAGCAT	30	
CAGAAGATTAGATAATACATTTGTCGACAA	30	
GTCGACTTCGGCCAACGCGCGGGGTTTTTC	30	
TAAAAGGGACATTCTGGCCAACAAAGCATC	30	
CTTTAGGGCCTGCAACAGTGCCAATACGTG	30	
CCTGATTGCAATATATGTGAGTGATCAATAGT	32	
CCAACAGGAGCGAACCAGACCGGAGCCTTTAC	32	
ACCGATTGTCGGCATTTTCGGTCATAATCA	30	
CTTTAATGCGGAACTGATAGCCCCACCAG	30	
GAGACAGCTAGCTGATAAAATTAATTTTTGT	30	
CTTATCATTCCCGACTTGCGGGAGCCTAATTT	32	
GCGCAGACAAGAGGCAAAAGAATCCCTCAG	30	
GAGAGATAGAGCGTCTTTCCAGAGGTTTTGAA	32	

CCTAAATCAAATCATAGGTCTAAACAGTA	30	
ATTATCATTCAATATAATCCTGACAATTAC	30	
AAGCCTGGTACGAGCCGGAAGCATAGATGATG	32	
ATCCCAATGAGAATTAAGTGAACAGTTACCAG	32	
GCGAAAAATCCCTTATAAATCAAGCCGGCG	30	
TATCCGGTCTCATCGAGAACAAGCGACAAAAG	32	
GTTTTAACTTAGTACCGCCACCCAGAGCCA	30	
AATTGAGAATTCTGTCCAGACGACTAAACCAA	32	
AGCCAGCAATTGAGGAAGGTTATCATCATTTT	32	
GGCCTTGAAGAGCCACCACCTCAGAAACCAT	32	
GCAAGGCCTCACCAGTAGCACCATGGGCTTGA	32	
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAACAGTAA	31	
ACGCTAACCCACAAGAATTGAAAATAGC	30	
AAATCACCTTCCAGTAAGCGTCAGTAATAA	30	
GCCCGTATCCGGAATAGGTGTATCAGCCCAAT	32	
CAGCGAACTTGCTTTCGAGGTGTTGCTAA	30	
ACCCTTCTGACCTGAAAGCGTAAGACGCTGAG	32	
AACAGTTTTGTACCAAAAACATTTTATTTT	30	
CACATTAATAATTGTTATCCGCTCATGCGGGCC	32	
GCTATCAGAAATGCAATGCCTGAATTAGCA	30	
CTTAGATTTAAGGCGTTAAATAAAGCCTGT	30	
ACACTCATCCATGTTACTTAGCCGAAAGCTGC	32	
TCTAAAGTTTTGTCGCTTTCCAGCCGACAA	31	
TCAATATCGAACCTCAAATATCAATTCCGAAA	32	
TGCATCTTTCCAGTCACGACGGCCTGCAG	30	
GAAATTATTGCCTTTAGCGTCAGACCGGAACC	32	
TCGGCAAATCCTGTTTGATGGTGGACCCTCAA	32	
CGCGCAGATTACCTTTTTTAATGGGAGAGACT	32	
AAGTAAGCAGACACCACGGAATAATATTGACG	32	
AGCAAGCGTAGGGTTGAGTGTTGTAGGGAGCC	32	
CAACTGTTGCGCCATTCGCCATTCAAACATCA	32	
TGTCACAATCTTACCGAAGCCCTTTAATATCA	32	
TCCACAGACAGCCCTCATAGTTAGCGTAACGA	32	
ATATTTTGGCTTTCATCAACATTATCCAGCCA	32	
CGGATTGCAGAGCTTAATTGCTGAAACGAGTA(A) <sub>30</sub>	32	NP-Anbindestelle „rechts“
AATGGTCAACAGGCAAGGCAAAGAGTAATGTG(A) <sub>30</sub>	32	NP-Anbindestelle „rechts“
GATTTAGTCAATAAAGCCTCAGAGAACCCTCA(A) <sub>30</sub>	32	NP-Anbindestelle „rechts“
GAGGGTAGGATTCAAAAGGGTGAGACATCCAATAAAT(A) <sub>30</sub>	37	NP-Anbindestelle „links“



AAATTAAGTTGACCATTAGATACTTTTGGGATGG(A) <sub>30</sub>	35	NP-Anbindestelle „links“
CATATAACCTGTTTAGCTAACCTTTAATTGCT(A) <sub>30</sub>	32	NP-Anbindestelle „links“
CCTTTCAAATATCGCGTTTGAGGGGGT	27	Stabilisierung
CTTATCAAAAAGATTAAGAGCGTCC	25	Stabilisierung
CGAAAGACTTTGATAAGAGGTCATATTCG	30	Atto647N

## 6.6. Gele

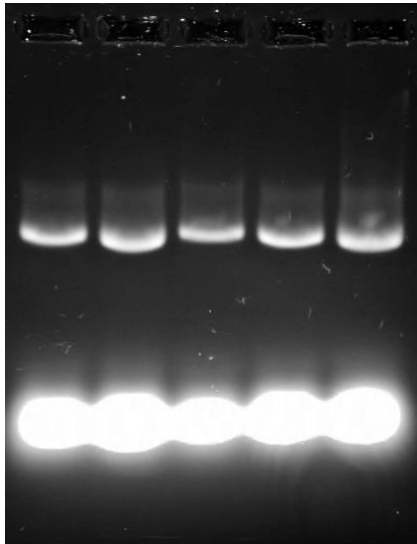


Abbildung A 12: Agarose-Gel des rechteckigen DNA-Origami.

## 6.7. Daten

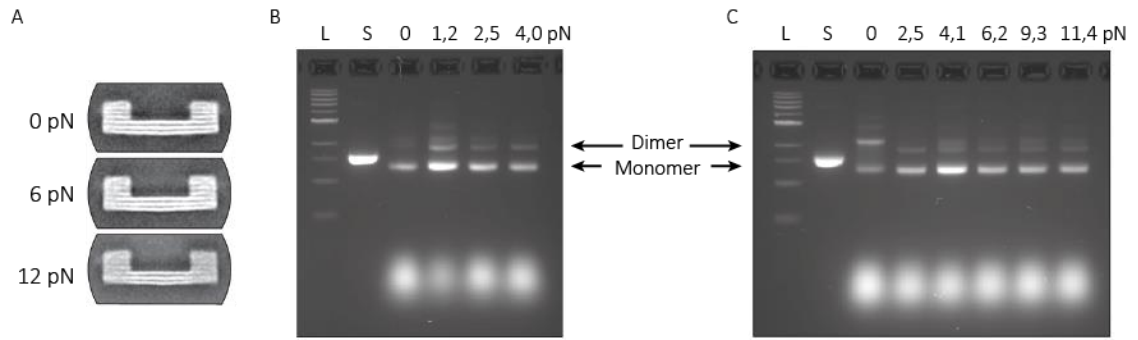


Abbildung A 13: A) TEM-Aufnahmen der Kraftklammer bei einer Kraft von 0 pN, 6 pN und 12 pN. B) Agarose-Gel der in der Kraftklammer verankerten Holliday Junction für die Kräfte von 0 pN bis 4 pN. C) Agarose Gel der für das TBP modifizierten Kraftklammer für die Kräfte von 0 pN bis 11,4 pN. L ist die DNA-Leiter und S der Gerüststrang [11].

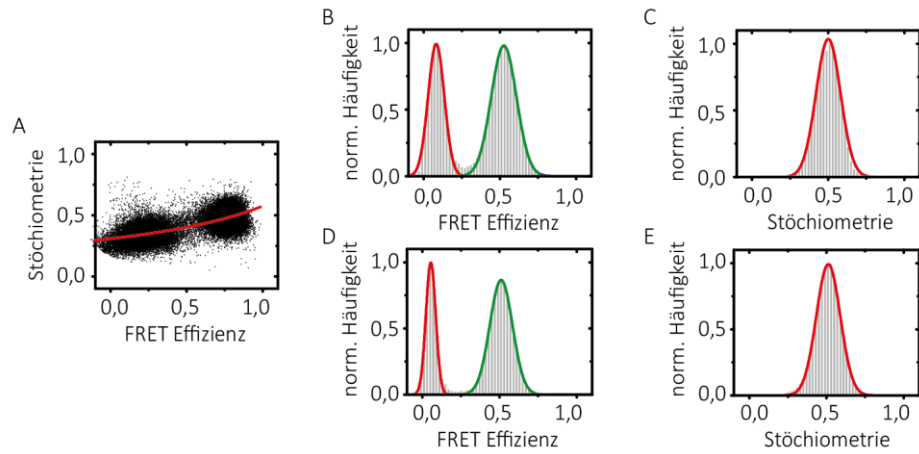


Abbildung A 14: Gamma-Korrektur der 0 pN Probe mit der Holliday Junction. A) Anpassen eines Fits an die Punktwolken der beiden FRET-Populationen. B, D) Histogramme über die FRET-Effizienz vor (B) und nach der Korrektur (D). C, E) Histogramme über die Stöchiometrie vor (C) und nach der Gamma-Korrektur (E).

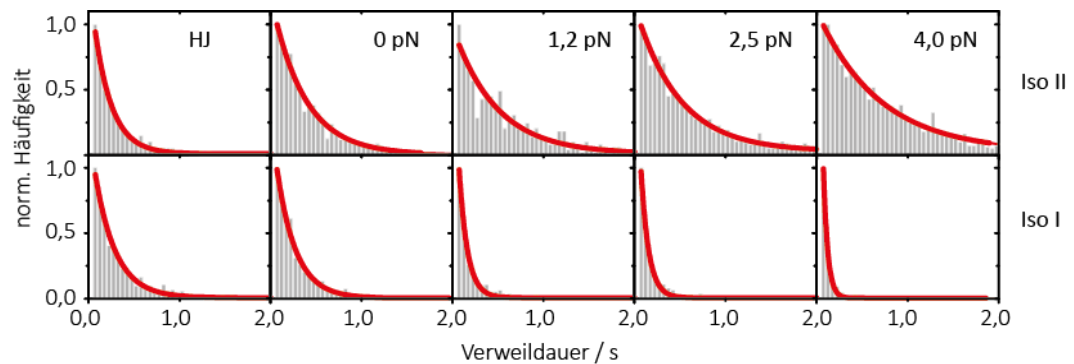


Abbildung A 15: Verweilzeit der Moleküle im Iso-I bzw. Iso-II Zustand für die einzelne Holliday Junction und die Holliday Junction innerhalb der Kraftklammer bei unterschiedlichen angelegten Kräften.

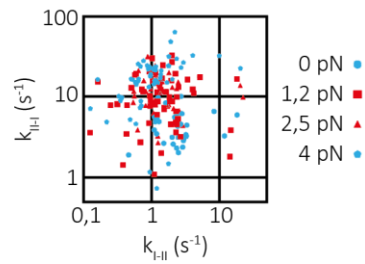


Abbildung A 16: Logarithmische Auftragung der Übergangsraten vom Iso-II in den Iso-I Zustand gegen die Übergangsraten vom Iso-I in den Iso-II Zustand für jede einzelne Spur aller Holliday Junctions.

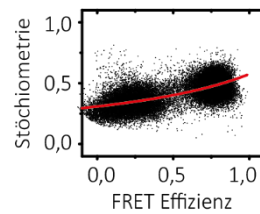


Abbildung A 17: Gamma-Korrektur der 0 pN Probe mit TBP. A) Anpassen eines Fits an die Punktwolken der beiden FRET-Populationen. B, D) Histogramme über die FRET-Effizienz vor (B) und nach der Korrektur (D). C, E) Histogramme über die Stöchiometrie vor (C) und nach der Gamma-Korrektur (E).

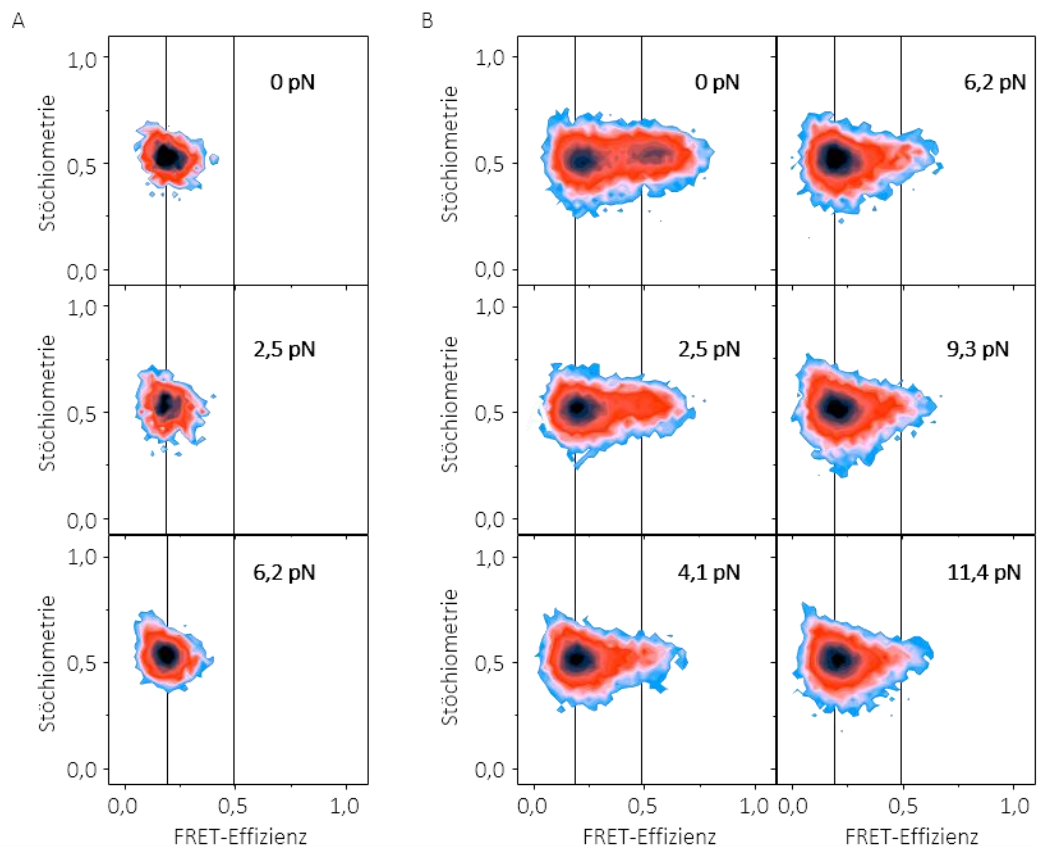


Abbildung A 18: Stöchiometrie-FRET-Effizienz-Plots für die Proben ohne TBP (A) und mit TBP (B) bei unterschiedlichen Kräften.

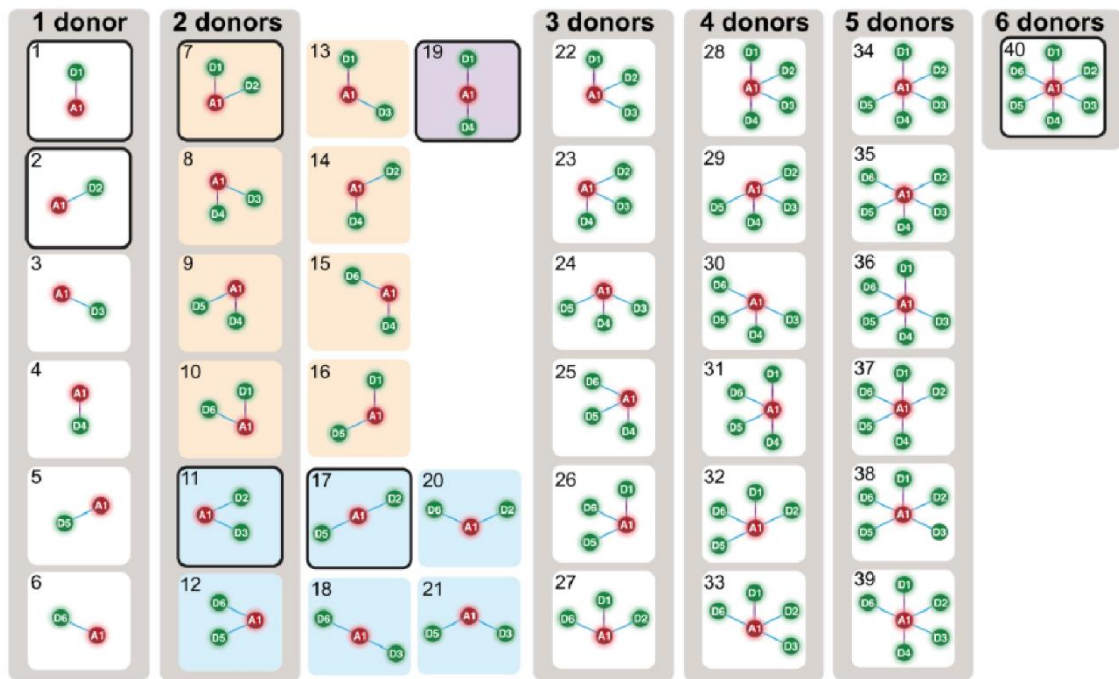


Abbildung A 19: Darstellung aller möglichen Kombinationen zwischen einem bis sechs Donormolekülen zu einem Akzeptormolekül [17]. Eingrahmt sind die mit Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie gemessenen Proben.

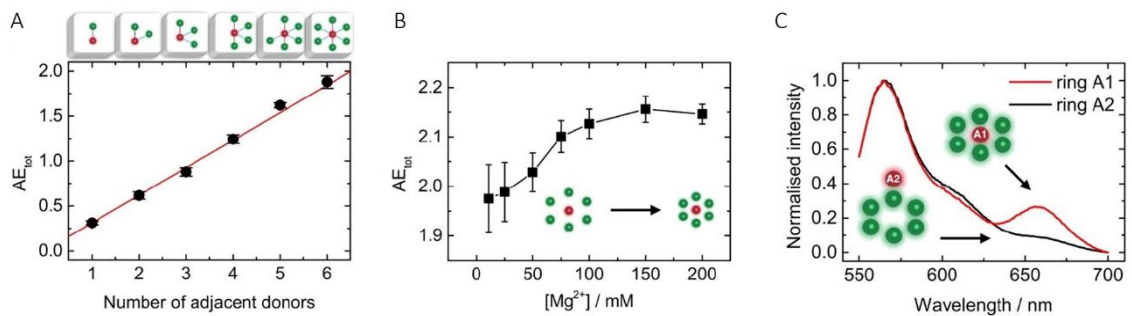


Abbildung A 20: A) Über alle möglichen Kombinationen gemittelter Antenneneffekt in Abhängigkeit von der Anzahl an Donormolekülen mit linearem Fit. B) Antenneneffekt in Abhängigkeit von der Konzentration an Magnesium-Ionen. C) Normalisierte Fluoreszenzintensität des synthetischen Lichtsammelkomplexes mit einem Akzeptor innerhalb (A1, rot) und außerhalb des Rings (A2, schwarz). Die Abbildung wurde verändert nach [17].

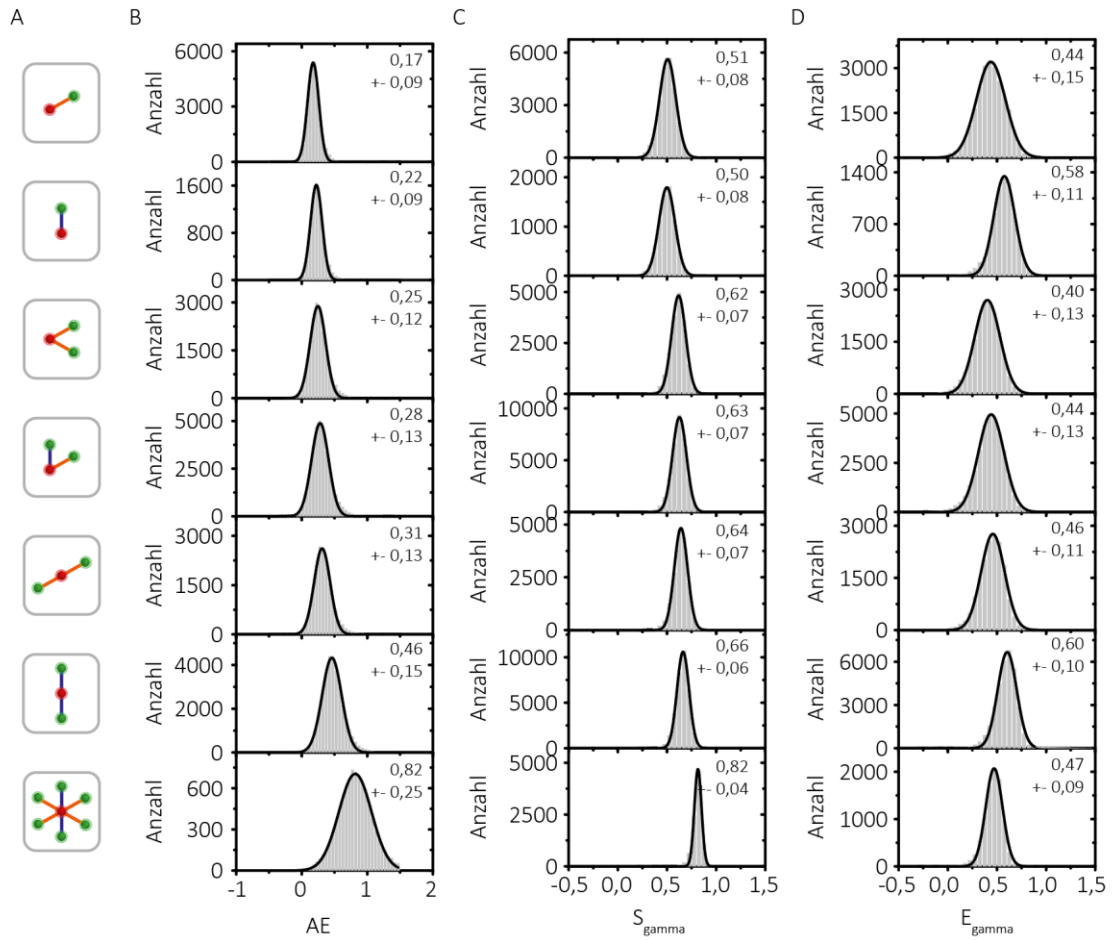


Abbildung A 21: A) Skizzen aller gemessenen Konfigurationen der Donormoleküle zum Akzeptormolekül auf dem DNA-Origami. B) Gemessener Antenneneffekt für die Proben aus (A). C) Gemessene Stöchiometrie der Proben aus (A). D) Gemessene FRET-Effizienzen der Proben aus (A). C) und D) sind gamma-korrigierte Werte.

Tabelle 3: Dielektrische Leitfähigkeit von Gold und Silber in Abhängigkeit von der Wellenlänge aus [47, 91].

Wellenlänge / nm	Gold: $\epsilon(\omega)$	Silber: $\epsilon(\omega)$
400	-1,66 + 5,74i	-4,42 + 0,21i
425	-1,70 + 5,67i	-5,77 + 0,21i
450	-1,76 + 5,30i	-7,01 + 0,21i
475	-1,80 + 4,69i	-8,42 + 0,29i
500	-2,57 + 3,64i	-9,80 + 0,31i
525	-4,21 + 2,53i	-11,31 + 0,35i
550	-5,93 + 2,10i	-12,94 + 0,43i
575	-7,61 + 1,78i	-14,44 + 0,40i
600	-9,39 + 1,53i	-16,07 + 0,44i
625	-11,21 + 1,32i	-17,77 + 0,49i
650	-12,95 + 1,12i	-19,44 + 0,46i
675	-14,70 + 1,05i	-21,21 + 0,43i
700	-16,49 + 1,06i	-23,06 + 0,39i
725	-18,28 + 1,15i	-24,99 + 0,36i
750	-20,15 + 1,25i	-26,99 + 0,32i
775	-22,07 + 1,37i	-28,98 + 0,35i
800	-24,06 + 1,51i	-31,02 + 0,41i
825	-26,14 + 1,64i	-33,17 + 0,46i
850	-28,27 + 1,75i	-35,59 + 0,48i
875	-30,49 + 1,85i	-38,09 + 0,49i
900	-32,72 + 2,00i	-40,59 + 0,51i
925	-34,89 + 2,22i	-42,98 + 0,52i
950	-37,12 + 2,46i	-45,44 + 0,54i
975	-39,43 + 2,70i	-47,96 + 0,55i
1000	-41,85 + 2,95i	-50,63 + 0,57i

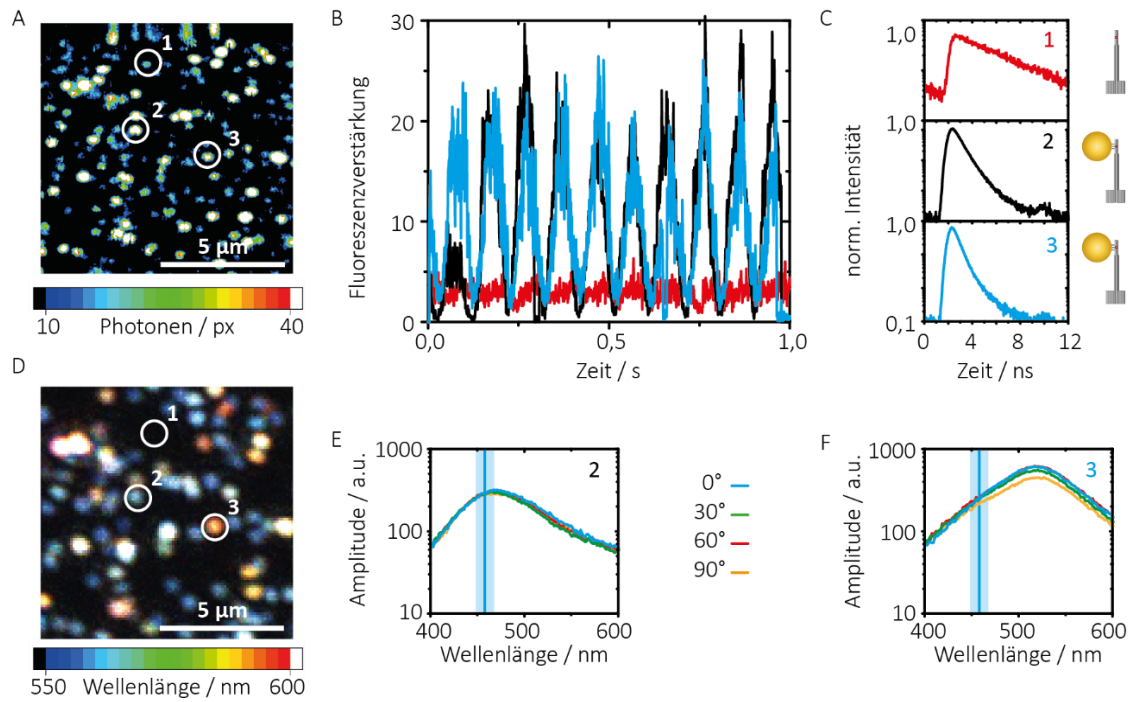


Abbildung A 22: Beispiel der Messung der Nanoantenne mit 80 nm Gold-NP als Monomer. A) Fluoreszenzbild, D) Dunkelfeldbild. In den Bildern wurden drei Moleküle beispielhaft herausgesucht: eine Nanoantenne ohne Gold-NP (1) und zwei Nanoantennen mit einem metallischen Gold-NP (2 und 3). B) Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Zeit für die drei Moleküle (1: rot, 2: schwarz, 3: blau) und entsprechende Fluoreszenzabklingkurven (C) für die drei Nanoantennen. E) und F) Polarisationsabhängige Streuspektren der Nanoantennen 2 und 3. Die blaue Linie (557 nm  $\pm$  10 nm) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau: 0°, grün: 30°, rot: 60°, orange: 90°.

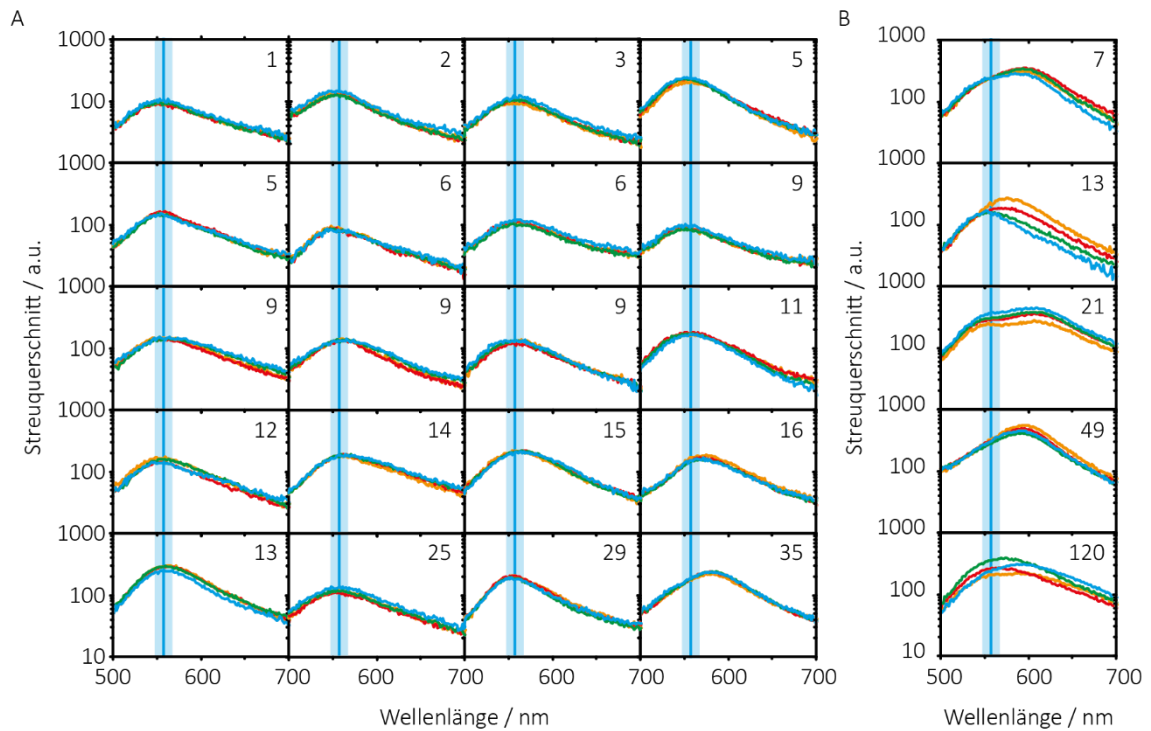


Abbildung A 23: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantennen mit einem 80 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $557 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. A) Monomere, die der erwarteten Form entsprechen. B) Monomere, die von der erwarteten Form abweichen. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

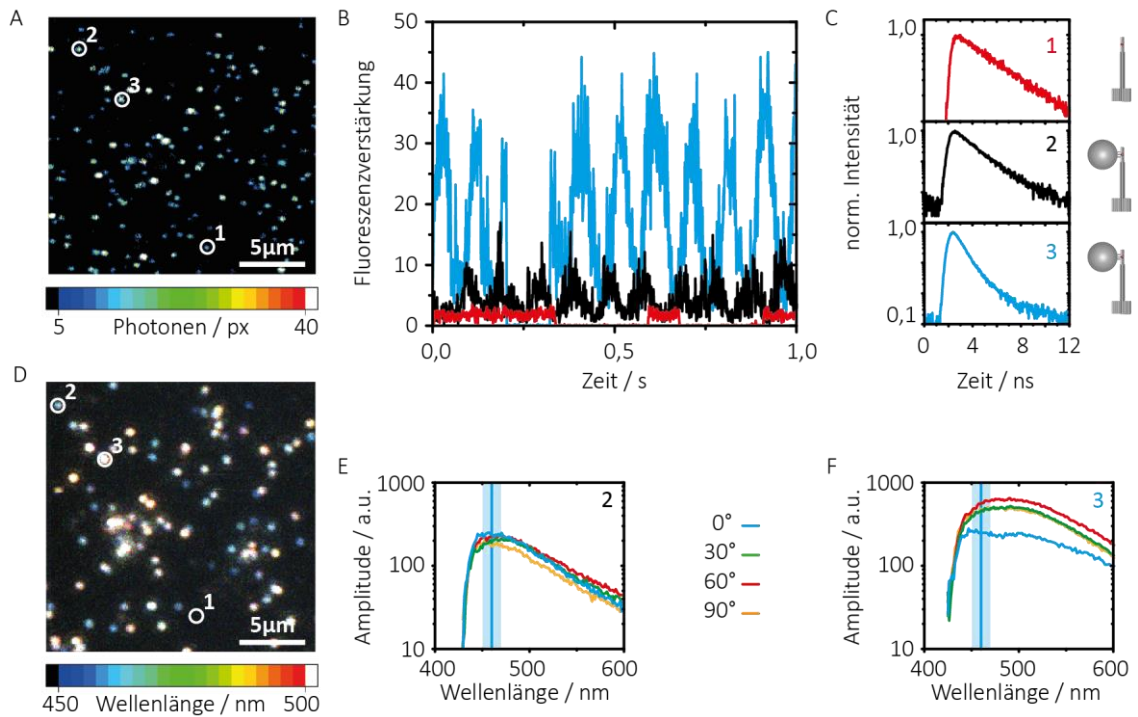


Abbildung A 24: Beispiel der Messung der Nanoantenne mit 80 nm Silber-NP als Monomer. A) Fluoreszenzbild, D) Dunkelfeldbild. In den Bildern wurden drei Moleküle beispielhaft herausgesucht: eine Nanoantenne ohne Silber-NP (1) und zwei Nanoantennen mit einem metallischen Silber-NP (2 und 3). B) Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Zeit für die drei Moleküle (1: rot, 2: schwarz, 3: blau) und entsprechende Fluoreszenzabklingkurven (C) für die drei Nanoantennen. E) und F) Polarisationsabhängige Streuspektren der Nanoantennen 2



und 3. Die blaue Linie ( $460 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$ .

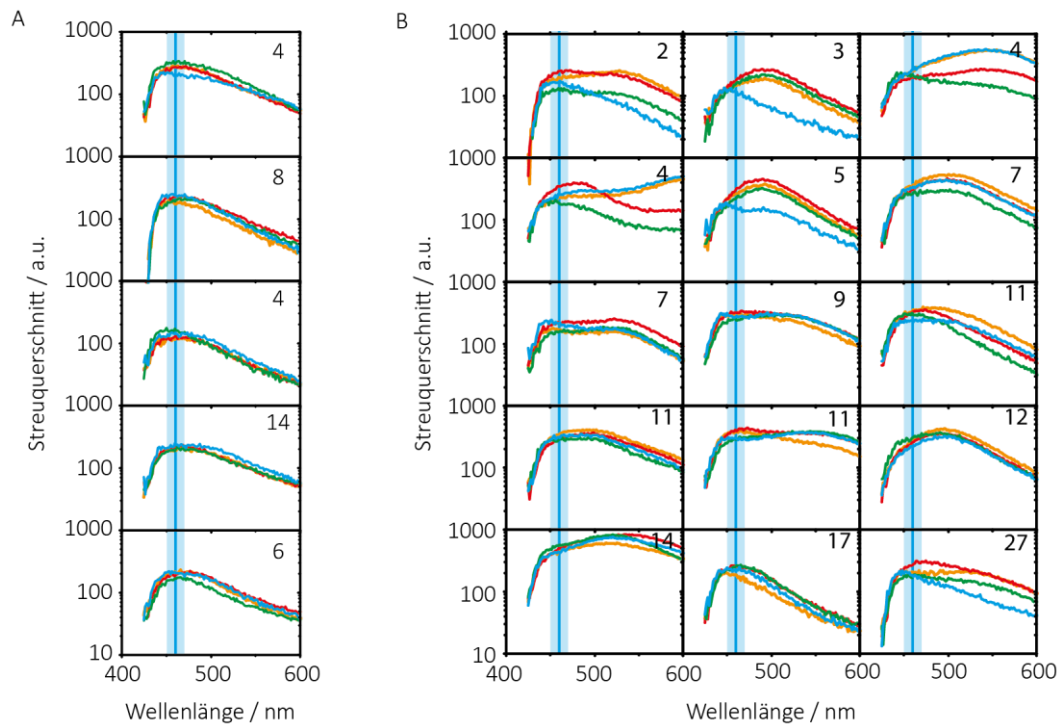


Abbildung A 25: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantennen mit einem 80 nm Silber-NP. Die blaue Linie ( $460 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. A) Monomere, die der erwarteten Form entsprechen. B) Monomere, die von der erwarteten Form abweichen. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

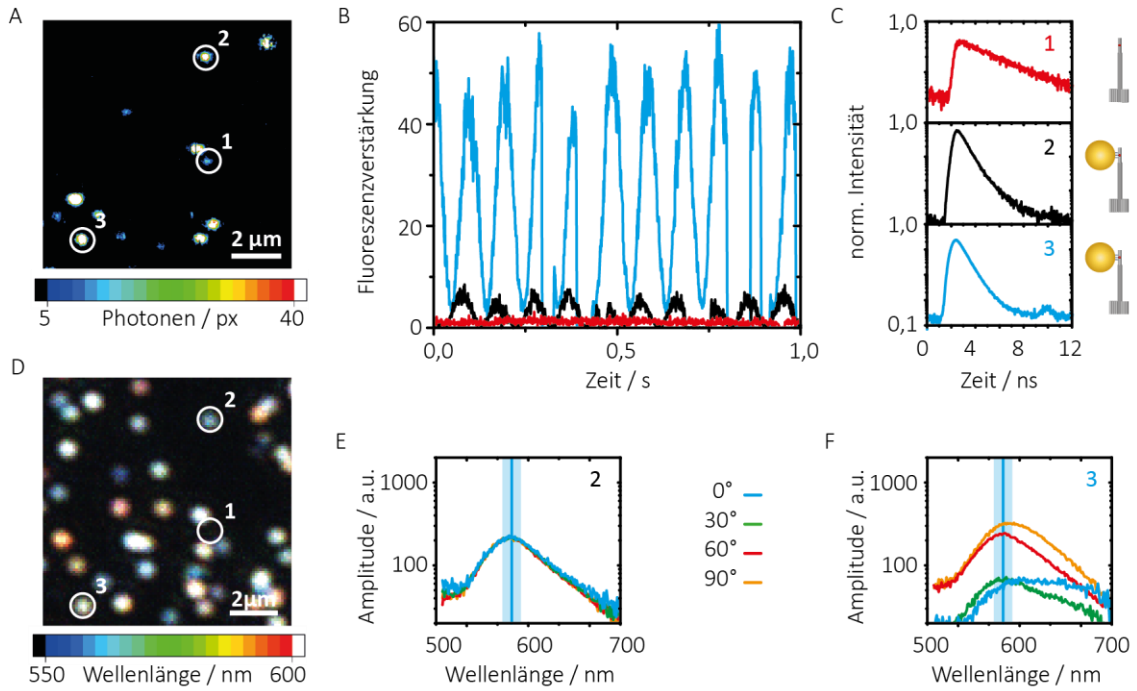


Abbildung A 26: Beispiel der Messung der Nanoantenne mit 100 nm Gold-NP als Monomer. A) Fluoreszenzbild, D) Dunkelfeldbild. In den Bildern wurden drei Moleküle beispielhaft herausgesucht: eine Nanoantenne ohne Gold-NP (1) und zwei Nanoantennen mit einem metallischen Gold-NP (2 und 3). B) Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Zeit für die drei Moleküle (1: rot, 2: schwarz, 3: blau) und entsprechende Fluoreszenzabklingkurven (C) für die drei Nanoantennen. E) und F) Polarisationsabhängige Streuspektren der Nanoantennen 2 und 3. Die blaue Linie ( $573 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$ .

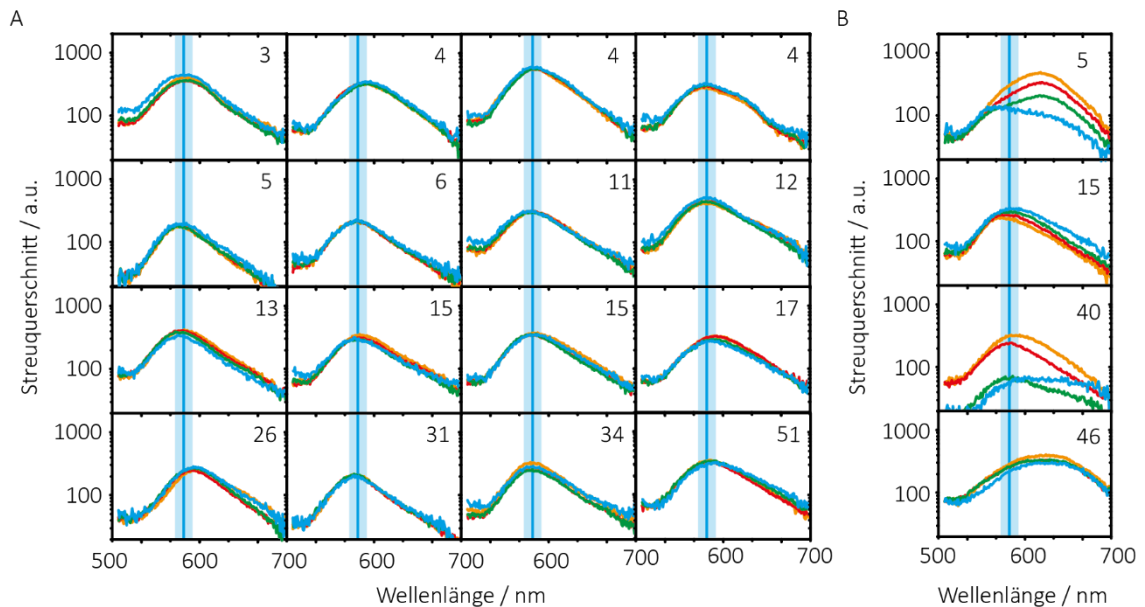


Abbildung A 27: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantennen mit einem 100 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $573 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. A) Monomere, die der erwarteten Form entsprechen. B) Monomere, die von der erwarteten Form abweichen. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

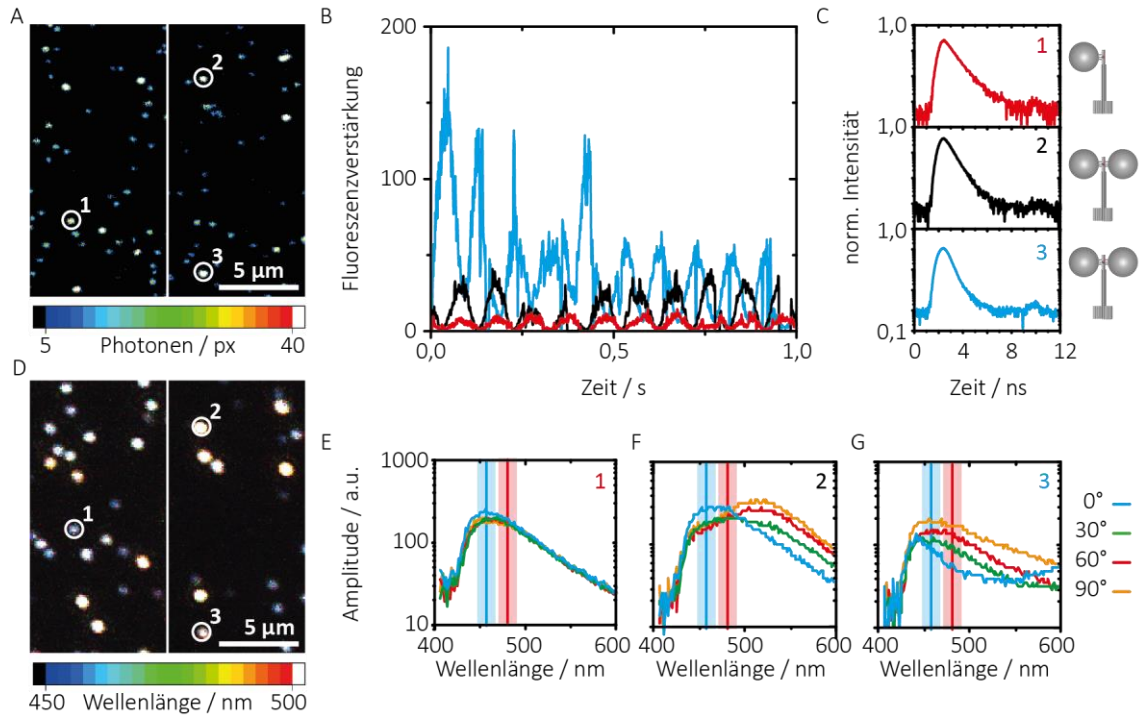


Abbildung A 28: Beispiel der Messung der Nanoantenne mit 80 nm Silber-NP als Dimer. A) Fluoreszenzbild, D) Dunkelfeldbild. In den Bildern wurden drei Moleküle beispielhaft herausgesucht: eine Nanoantenne mit einem Silber-NP (1) und zwei Nanoantennen mit zwei Silber-NP (2 und 3). B) Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Zeit für die drei Moleküle (1: rot; 2: schwarz; 3: blau) und entsprechende Fluoreszenzabklingkurven (C) für die drei Nanoantennen. E), F) und G) Polarisationsabhängige Streuspektren der Nanoantennen 1, 2 und 3. Die blaue Linie ( $460 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge und die rote Linie bei  $482 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  die mittlere Rot-Verschiebung des Dimers. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ ; grün:  $30^\circ$ ; rot:  $60^\circ$ ; orange:  $90^\circ$ .

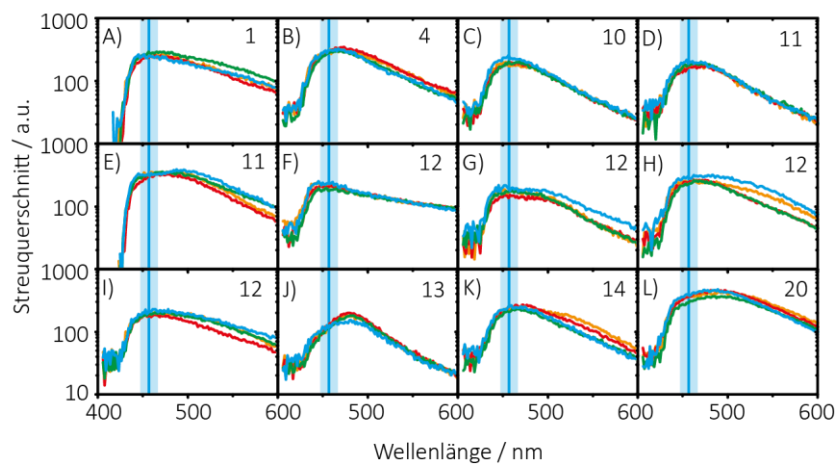


Abbildung A 29: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantennen der Dimer-Probe mit nur einem 80 nm Silber-NP. Die blaue Linie ( $460 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ ; grün:  $30^\circ$ ; rot:  $60^\circ$ ; orange:  $90^\circ$ .

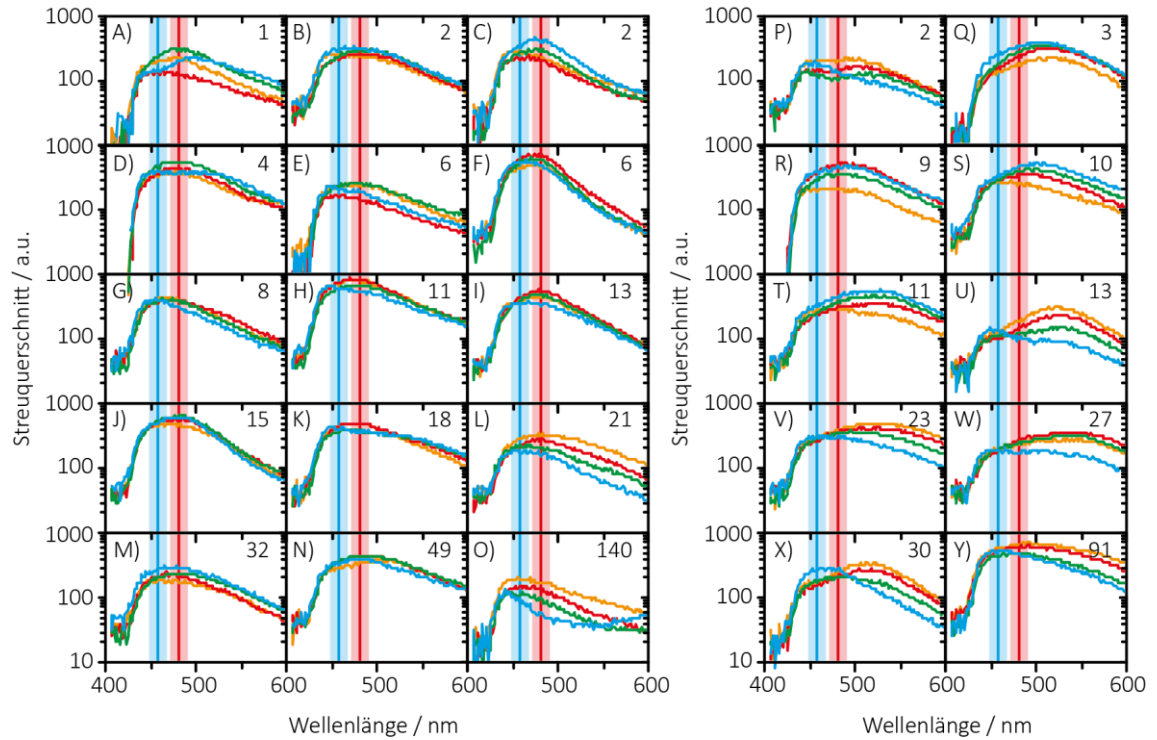


Abbildung A 30: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantenen der Dimer-Probe mit zwei 80 nm Silber-NP. Die blaue Linie ( $460 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge und die rote Linie bei  $482 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  die mittlere Rot-Verschiebung des Dimers. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$ .

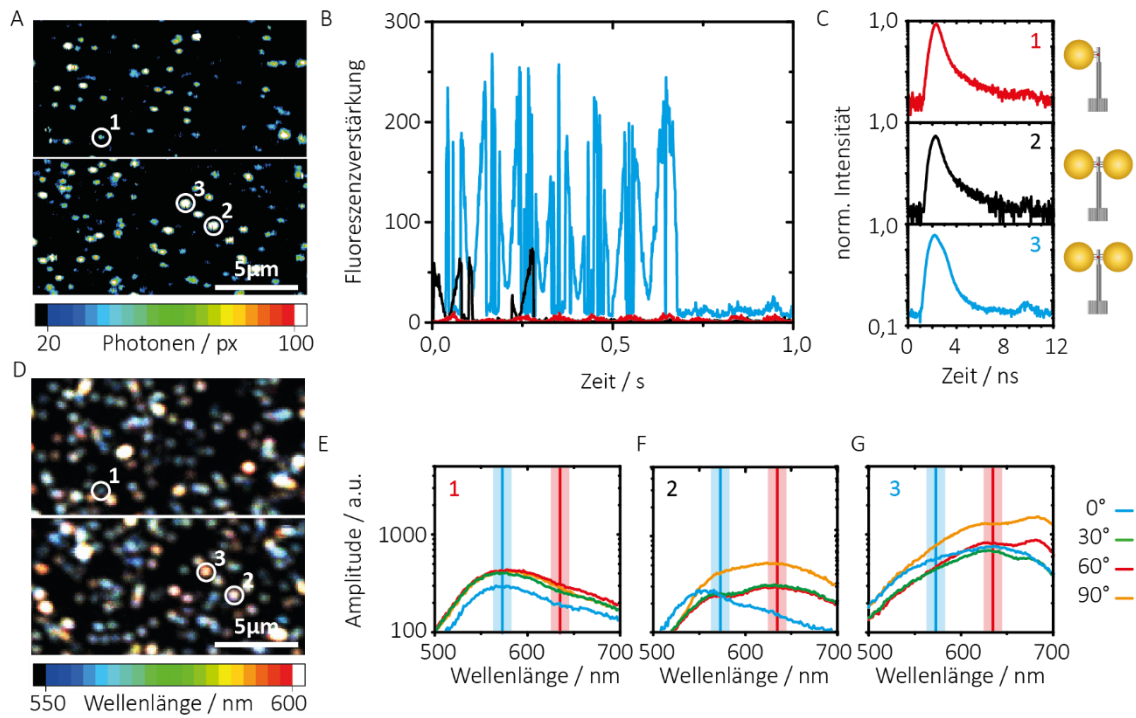


Abbildung A 31: Beispiel der Messung der Nanoantenne mit 100 nm Gold-NP als Dimer. A) Fluoreszenzbild, D) Dunkelfeldbild. In den Bildern wurden drei Moleküle beispielhaft herausgesucht: eine Nanoantenne mit einem Gold-NP (1) und zwei Nanoantennen mit zwei Gold-NP (2)

und 2). B) Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Zeit für die drei Moleküle (1: rot, 2: schwarz, 3: blau) und entsprechende Fluoreszenzabklingkurven (C) für die drei Nanoantennen. E), F) und G) Polarisationsabhängige Streuspektren der Nanoantennen 1, 2 und 3. Die blaue Linie ( $573 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge und die rote Linie bei  $635 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  die mittlere Rot-Verschiebung des Dimers. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$ .

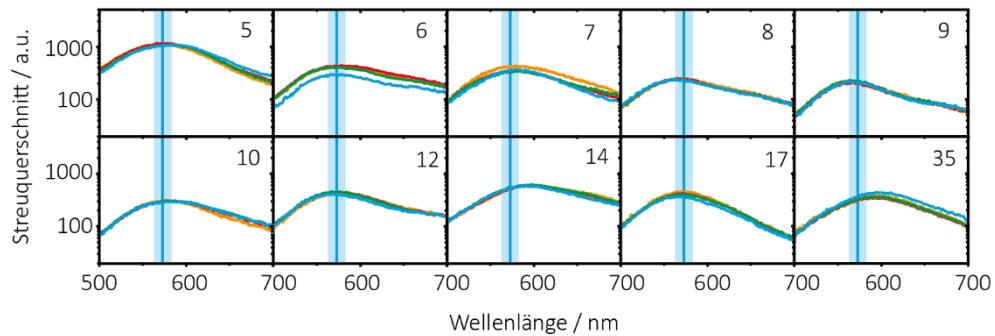


Abbildung A 32: Ausgewählte Streuspektren der Nanoantennen der Dimer-Probe mit nur einem 100 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $573 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

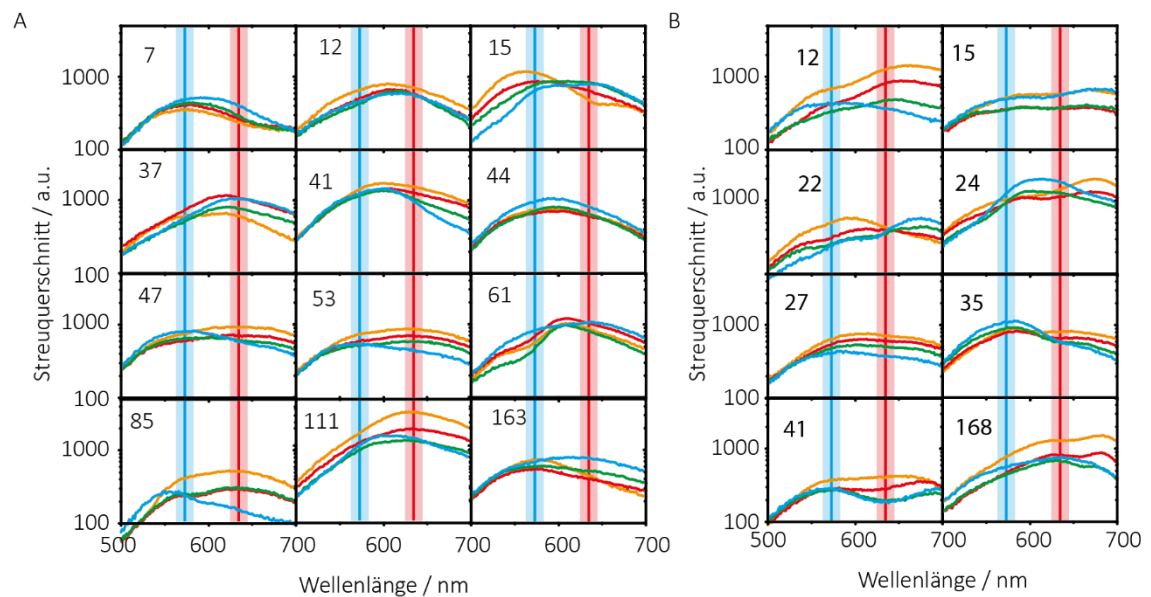


Abbildung A 33: Ausgewählte Streuspektren der Nanoantennen der Dimer-Probe mit zwei 100 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $573 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge und die rote Linie bei  $635 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  die mittlere Rot-Verschiebung des Dimers. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

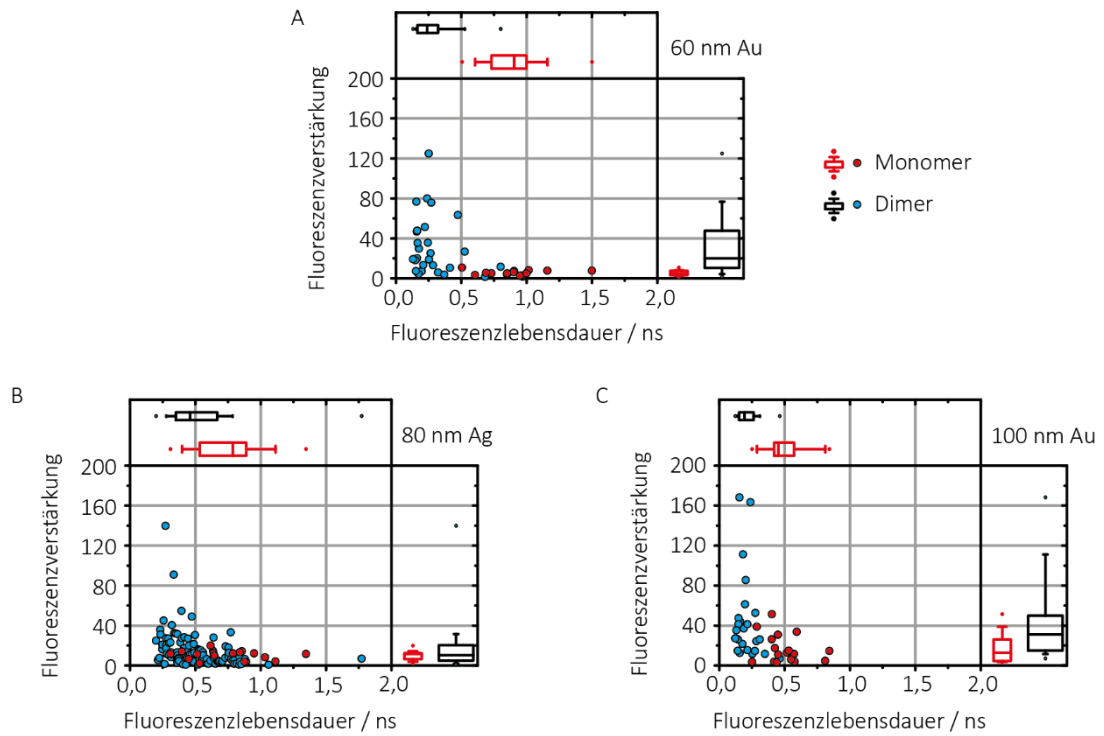


Abbildung A 34: Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Fluoreszenzlebensdauer für die NA mit A) 60 nm Gold-NP, B) 80 nm Silber-NP, C) 100 nm Gold-NP als Monomer und Dimer. Die Box umfasst alle Moleküle, die sich innerhalb des Intervalls von 25-75% befinden, wohingegen die Grenzbalken noch die Moleküle zwischen 10-90% einbezieht. Die Punkte stellen die Maxima und Minima der Probe dar. Die Linie innerhalb der Box ist der Median.

Tabelle 4: Monomere Korrelation

	Fluoreszenzlebensdauer/Fluoreszenzverstärkung			
	60 nm Gold	80 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	0,03	-0,15	-0,26	-0,09
$ T $	0,12	1,09	1,05	0,22
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,95	2,67	2,90	3,35
	Fluoreszenzlebensdauer/Streuwellenlänge			
	60 nm Gold	80 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	-0,35	-0,30	-0,49	-0,44
$ T $	1,36	2,26	2,13	1,21
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,95	2,67	2,90	3,35
	Fluoreszenzlebensdauer/Streuquerschnitt			
	60 nm Gold	80 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	-0,45	-0,19	-0,41	-0,17
$ T $	1,79	1,34	1,73	0,41
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,95	2,67	2,90	3,35
	Fluoreszenzverstärkung/Streuwellenlänge			
	60 nm Gold	80 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	-0,20	0,16	0,14	0,52
$ T $	0,75	1,18	0,55	1,48
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,95	2,67	2,90	3,35
	Fluoreszenzverstärkung/Streuquerschnitt			
	60 nm Gold	80 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	-0,21	0,46	-0,19	0,40
$ T $	0,77	3,66	0,76	1,08
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,95	2,67	2,90	3,35
	Streuwellenlänge/Streuquerschnitt			
	60 nm Gold	80 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	0,69	0,33	0,15	-0,08
$ T $	3,42	2,45	0,57	0,20
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,95	2,67	2,90	3,35



Tabelle 5: Dimere Korrelation

	Fluoreszenzlebensdauer/Fluoreszenzverstärkung		
	60 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	-0,19	-0,22	-0,31
$ T $	0,99	1,05	3,33
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,77	2,80	2,62
	Fluoreszenzlebensdauer/Streuwellenlänge		
	60 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	-0,05	-0,26	-0,01
$ T $	0,24	1,28	0,09
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,77	2,80	2,62
	Fluoreszenzlebensdauer/Streuquerschnitt		
	60 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	-0,22	-0,31	0,04
$ T $	1,12	1,54	0,44
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,77	2,80	2,62
	Fluoreszenzverstärkung/Streuwellenlänge		
	60 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	0,30	-0,07	-0,03
$ T $	1,57	0,33	0,27
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,77	2,80	2,62
	Fluoreszenzverstärkung/Streuquerschnitt		
	60 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	0,1	0,2	0,14
$ T $	0,48	0,98	1,38
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,77	2,80	2,62
	Streuwellenlänge/Streuquerschnitt		
	60 nm Gold	100 nm Gold	80 nm Silber
$R_{xy}$	0,22	0,07	-0,1
$ T $	1,14	0,34	1,04
$t_{n-2;1-0,01/2}$	2,77	2,80	2,62



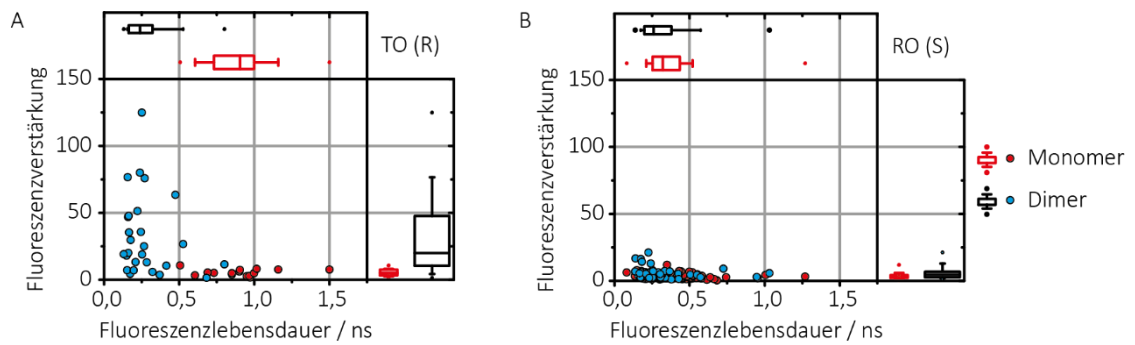


Abbildung A 35: Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Fluoreszenzlebensdauer für A) die NA mit 60 nm Gold-NP und B) das RO mit 60 nm Gold-NP als Monomer und Dimer. Die Box umfasst alle Moleküle, die sich innerhalb des Intervalls von 25-75% befinden, wohingegen die Grenzbalken noch die Moleküle zwischen 10-90% einbezieht. Die Punkte stellen die Maxima und Minima der Probe dar. Die Linie innerhalb der Box ist der Median.

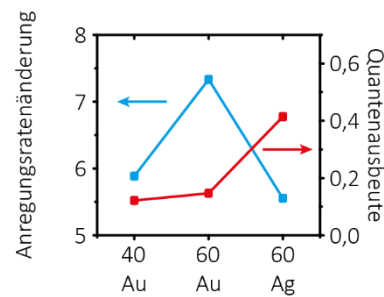


Abbildung A 36: Änderung der Anregungsrate (blau) und der Quantenausbeute (rot) in Abhängigkeit vom mNP.

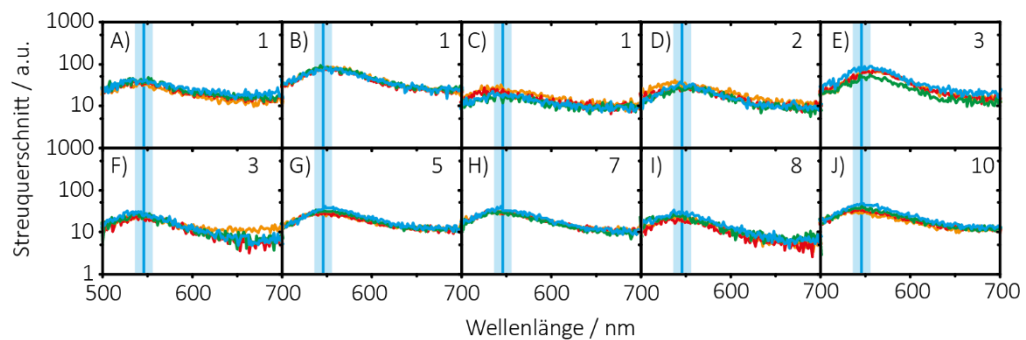


Abbildung A 37: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantennen der NRO-Probe mit nur einem 40 nm Gold-NP. Die blaue Linie (546 nm  $\pm$  10 nm) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau: 0°, grün: 30°, rot: 60°, orange: 90° und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

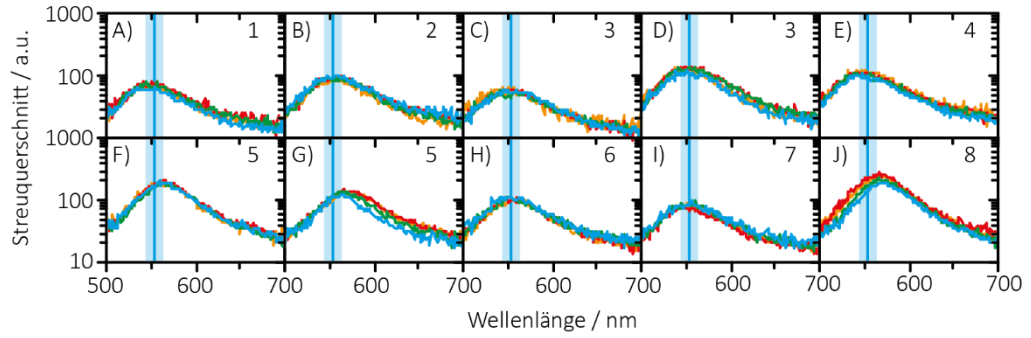


Abbildung A 38: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantenen der NRO-Probe mit nur einem 60 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $553 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

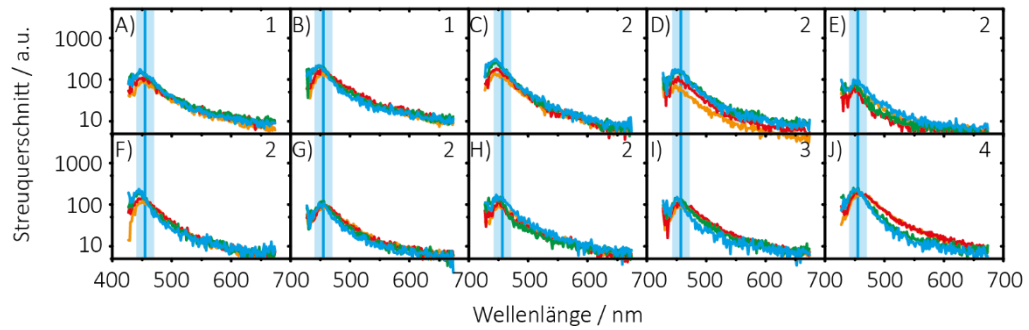


Abbildung A 39: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantenen der NRO-Probe mit nur einem 60 nm Silber-NP. Die blaue Linie ( $455 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

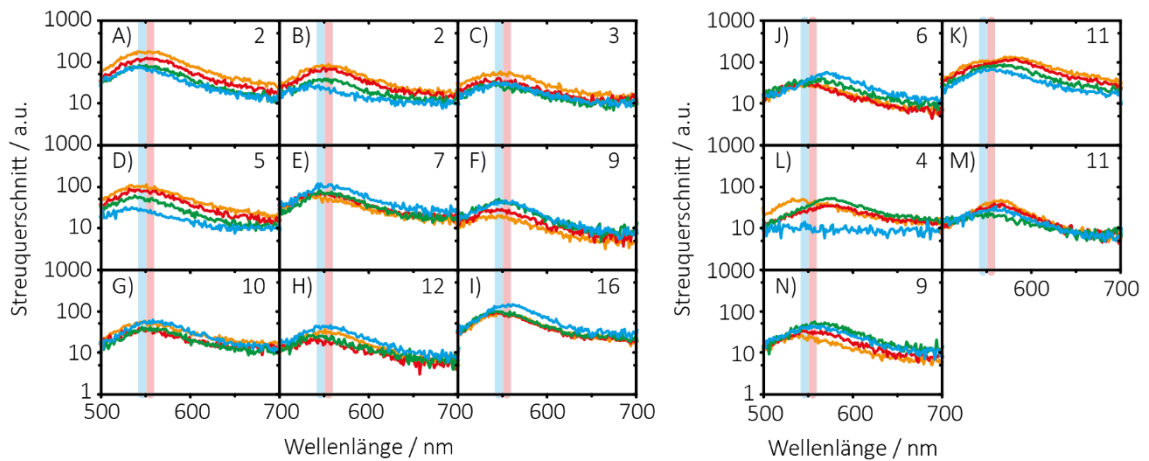


Abbildung A 40: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantenen der NRO-Probe mit zwei 40 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $546 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge und die rote Linie bei  $555 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  die mittlere Rot-Verschiebung des Dimers. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

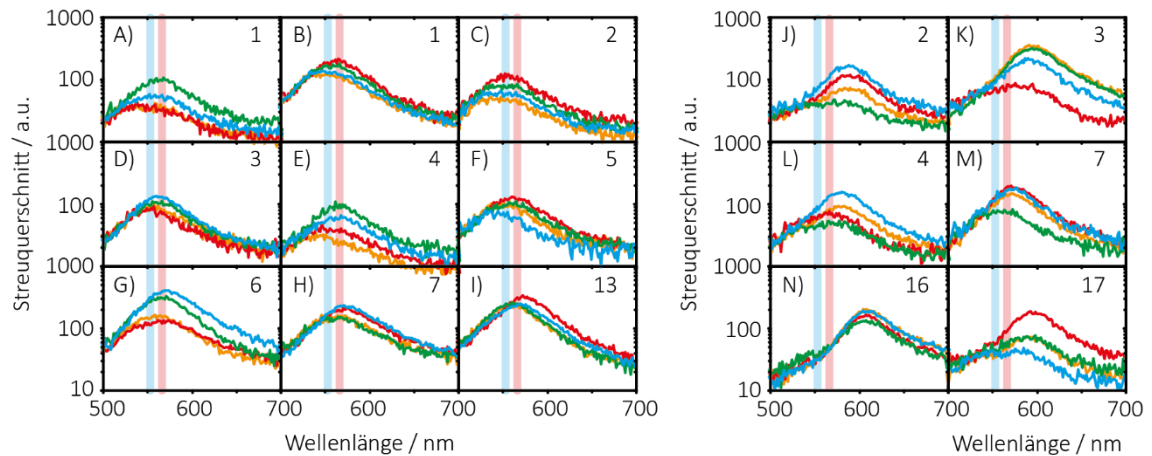


Abbildung A 41: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantennen der NRO-Probe mit zwei 60 nm Gold-NP. Die blaue Linie ( $553 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge und die rote Linie bei  $566 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  die mittlere Rot-Verschiebung des Dimers. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

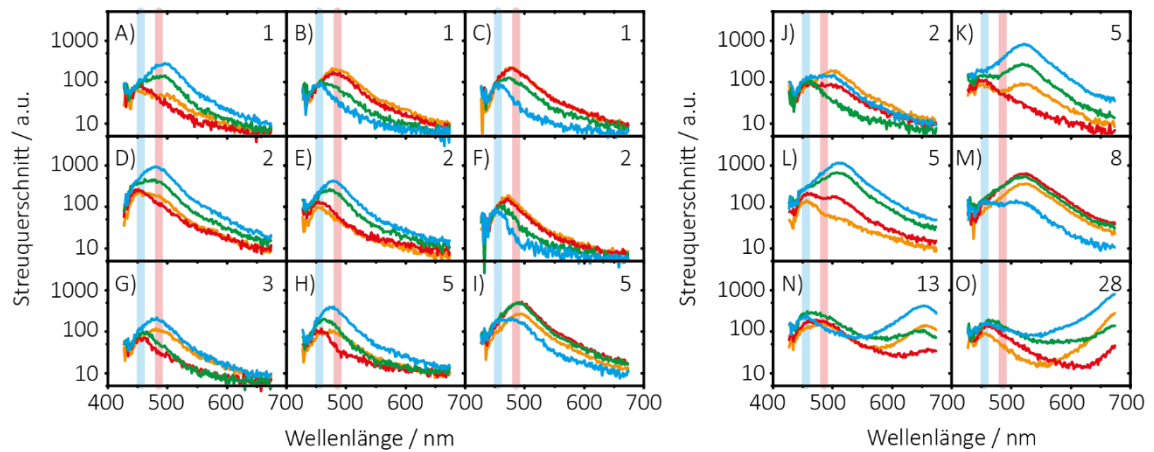


Abbildung A 42: Ausgewählte Streuspektren der Nanonantennen der NRO-Probe mit zwei 60 nm Silber-NP. Die blaue Linie ( $455 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) ist die aus Abbildung 63 ermittelte mittlere Streuwellenlänge und die rote Linie bei  $486 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  die mittlere Rot-Verschiebung des Dimers. Die Farben der Streuspektren repräsentieren die unterschiedlichen Einstellungen des Linearpolarisators: blau:  $0^\circ$ , grün:  $30^\circ$ , rot:  $60^\circ$ , orange:  $90^\circ$  und die Zahlen in den Graphen sind die Fluoreszenzverstärkung für die jeweilige Nanoantenne.

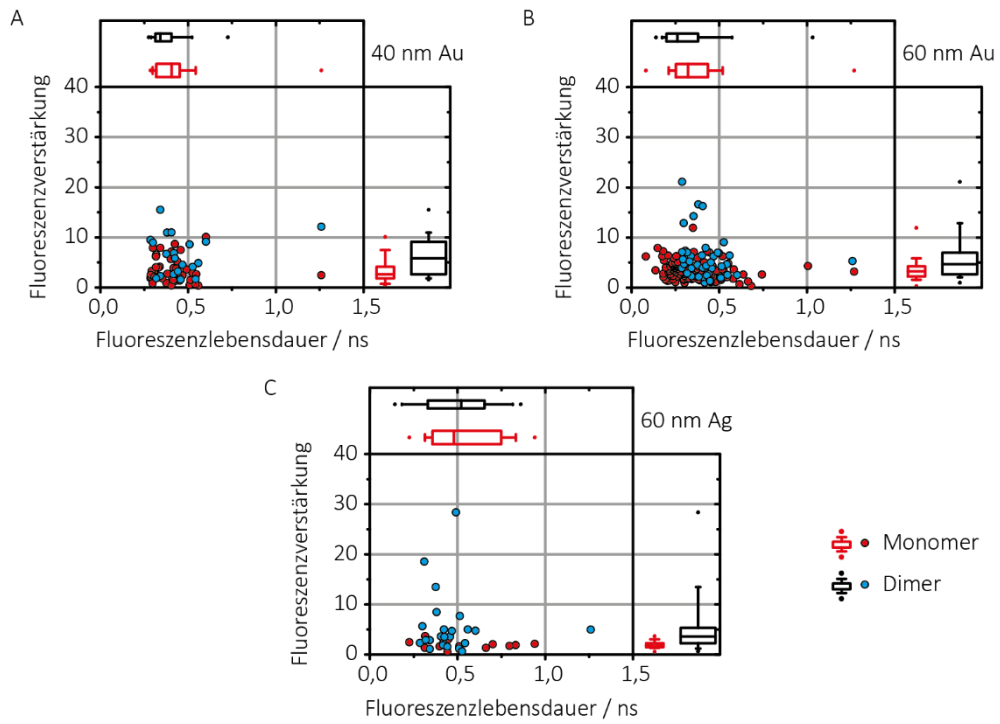


Abbildung A 43: Fluoreszenzverstärkung in Abhängigkeit von der Fluoreszenzlebensdauer für das RO mit A) 40 nm Gold-NP, B) 60 nm Gold-NP, C) 60 nm Silber-NP als Monomer und Dimer. Die Box umfasst alle Moleküle, die sich innerhalb des Intervalls von 25-75% befinden, wohingegen die Grenzbalken noch die Moleküle zwischen 10-90% einbezieht. Die Punkte stellen die Maxima und Minima der Probe dar. Die Linie innerhalb der Box ist der Median.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. <i>atomic force microscopy</i> )
AOTF	akusto-optisch abstimmbarer Filter (engl. <i>acousto-optical tunable filter</i> )
APD	Avalanche Photodiode
BSA	Bovine Serum Albumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMFM	Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie
EOM	elektrooptischer Modulator
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
FWHM	Breite auf halber Höhe (engl. <i>Full Width at Half Maximum</i> )
HJ	Holliday Junction
IC	Innere Umwandlung (engl. <i>Internal conversion</i> )
IRF	Antwort des Instruments (engl. <i>Instrument Response Function</i> )
ISC	Interkombination (engl. <i>intersystem crossing</i> )
LSK	Lichtsammelkomplex
mNP	metallische Nanopartikel
NA	Nanoantenne
PALM	photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RO	rechteckiges DNA-Origami
ROXS	System aus Reduktions- und Oxidationsmittel (engl. <i>reducing and oxidizing system</i> )
(R)-Konfiguration	Reißverschlusses-Konfiguration
(S)-Konfiguration	Scheren-Konfiguration
smFRET	Einzelmolekül-FRET (engl. <i>single-molecule FRET</i> )
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. <i>signal-to-noise ratio</i> )
ssDNA	einzelsträngige DNA
STED	Abregung durch stimulierte Emission (engl. <i>stimulated emission depletion</i> )
STORM	stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TCSPC	zeit-aufgelöste Einzelphotonen Messung (engl. <i>time-correlated single-photon counting</i> )
TFB	Transkriptionsinitiationsfaktor B
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIRF	totale interne Reflektion
TO	turmförmiges DNA-Origami
ZMW	Nanoapertur (engl. <i>zeromode waveguide</i> )

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Hohng, S., Zhou, R., Nahas, M.K., Yu, J., Schulten, K., Lilley, D.M.J., Ha, T. (2007) Fluorescence-Force Spectroscopy Maps Two-Dimensional Reaction Landscape of the Holliday Junction. *Science*, **318** (5848), 279.
- 2 Gietl, A., Holzmeister, P., Blombach, F., Schulz, S., Voithenberg, L.V. von, Lamb, D.C., Werner, F., Tinnefeld, P., Grohmann, D. (2014) Eukaryotic and archaeal TBP and TFB/TF(II)B follow different promoter DNA bending pathways. *Nucleic acids research*, **42** (10), 6219–6231.
- 3 Bettina Wünsch, Philipp Nickels, Tim Schröder, Dina Grohmann, Tim Liedl, Philip Tinnefeld (2017) Molekulare Kraftklammer: Kraftspektroskopie leicht gemacht. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, **61** (1), 28–31.
- 4 Smith, S.B., Cui, Y., Bustamante, C. (1996) Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *Science*, **271** (5250), 795.
- 5 Kellermayer, M.S.Z., Smith, S.B., Granzier, H.L., Bustamante, C. (1997) Folding-Unfolding Transitions in Single Titin Molecules Characterized with Laser Tweezers. *Science*, **276** (5315), 1112.
- 6 Ribbeck, N. and Saleh, O.A. (2008) Multiplexed single-molecule measurements with magnetic tweezers. *The Review of scientific instruments*, **79** (9), 94301.
- 7 Halvorsen, K. and Wong, W.P. (2010) Massively parallel single-molecule manipulation using centrifugal force. *Biophysical Journal*, **98** (11), L53-5.
- 8 Shroff, H., Reinhard, B.M., Siu, M., Agarwal, H., Spakowitz, A., Liphardt, J. (2005) Biocompatible Force Sensor with Optical Readout and Dimensions of 6 nm 3. *Nano Lett.*, **5** (7), 1509–1514.
- 9 Shen, W., Bruist, M.F., Goodman, S.D., Seeman, N.C. (2004) A protein-driven DNA device that measures the excess binding energy of proteins that distort DNA. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **43** (36), 4750–4752.
- 10 Gu, H., Yang, W., Seeman, N.C. (2010) DNA scissors device used to measure MutS binding to DNA mis-pairs. *Journal of the American Chemical Society*, **132** (12), 4352–4357.
- 11 Nickels, P.C., Wünsch, B., Holzmeister, P., Bae, W., Kneer, L.M., Grohmann, D., Tinnefeld, P., Liedl, T. (2016) Molecular force spectroscopy with a DNA origami-based nanoscopic force clamp. *Science*, **354** (6310), 305.
- 12 Rothmund, P.W.K. (2006) Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, **440** (7082), 297–302.
- 13 G. Drews. *Current Topics in Bioenergetics*, **1978** (8), 161–207.
- 14 Hu, X., Damjanovic, A., Ritz, T., Schulten, K. (1998) Architecture and mechanism of the light-harvesting apparatus of purple bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95** (11), 5935–5941.
- 15 Buckhout-White, S., Spillmann, C.M., Algar, W.R., Khachatryan, A., Melinger, J.S., Goldman, E.R., Ancona, M.G., Medintz, I.L. (2014) Assembling programmable FRET-based photonic networks using designer DNA scaffolds. *Nature communications*, **5**, 5615.
- 16 Dutta, P.K., Varghese, R., Nangreave, J., Lin, S., Yan, H., Liu, Y. (2011) DNA-directed artificial light-harvesting antenna. *Journal of the American Chemical Society*, **133** (31), 11985–11993.
- 17 Hemmig, E.A., Creatore, C., Wunsch, B., Hecker, L., Mair, P., Parker, M.A., Emmott, S., Tinnefeld, P., Keyser, U.F., Chin, A.W. (2016) Programming Light-Harvesting Efficiency Using DNA Origami. *Nano Letters*, **16** (4), 2369–2374.
- 18 Holzmeister, P., Acuna, G.P., Grohmann, D., Tinnefeld, P. (2014) Breaking the concentration limit of optical single-molecule detection. *Chem. Soc. Rev.*, **43** (4), 1014–1028.

- 19 Levene, M.J., Korlach, J., Turner, S.W., Foquet, M., Craighead, H.G., Webb, W.W. (2003) Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science (New York, N.Y.)*, **299** (5607), 682–686.
- 20 Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Dewinter, A., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C., Marks, P., Maxham, M., Murphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips, M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J., Wegener, J., Wu, D., Yang, A., Zaccarin, D., Zhao, P., Zhong, F., Korlach, J., Turner, S. (2009) Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)*, **323** (5910), 133–138.
- 21 Pibiri, E., Holzmeister, P., Lalkens, B., Acuna, G.P., Tinnefeld, P. (2014) Single-Molecule Positioning in Zeromode Waveguides by DNA Origami Nanoadapters. *Nano Letters*, **14** (6), 3499–3503.
- 22 Kinkhabwala, A., Yu, Z., Fan, S., Avlasevich, Y., Müllen, K., Moerner, W.E. (2009) Large single-molecule fluorescence enhancements produced by a bowtie nanoantenna. *Nature Photon*, **3** (11), 654–657.
- 23 Punj, D., Mivelle, M., Moparthi, S.B., van Zanten, T.S., Rigneault, H., van Hulst, N.F., García-Parajó, M.F., Wenger, J. (2013) A plasmonic 'antenna-in-box' platform for enhanced single-molecule analysis at micromolar concentrations. *Nature nanotechnology*, **8** (7), 512–516.
- 24 Acuna, G.P., Moller, F.M., Holzmeister, P., Beater, S., Lalkens, B., Tinnefeld, P. (2012) Fluorescence Enhancement at Docking Sites of DNA-Directed Self-Assembled Nanoantennas. *Science*, **338** (6106), 506–510.
- 25 Anger, P., Bharadwaj, P., Novotny, L. (2006) Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Physical Review Letters*, **96** (11).
- 26 Puchkova, A., Vietz, C., Pibiri, E., Wünsch, B., Sanz Paz, M., Acuna, G.P., Tinnefeld, P. (2015) DNA Origami Nanoantennas with over 5000-fold Fluorescence Enhancement and Single-Molecule Detection at 25  $\mu$ M. *Nano Lett*, **15** (12), 8354–8359.
- 27 Kasha, M. (1950) Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discuss. Faraday Soc.*, **9** (0), 14–19.
- 28 Franck, J. and Dymond, E.G. (1926) Elementary processes of photochemical reactions. *Trans. Faraday Soc.*, **21** (February), 536.
- 29 Condon, E.U. (1991) A Theory of Intensity Distribution in Band Systems, in *Selected Scientific Papers of E.U. Condon* (eds A.O. Barut, H. Odabasi, A. van der Merwe), Springer New York, New York, NY, pp. 1–19.
- 30 J. Widengren, R.R. (1996) Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biointerface*, **4** (3), 149–157.
- 31 Rasnik, I., McKinney, S.A., Ha, T. (2006) Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat Meth*, **3** (11), 891–893.
- 32 Aitken, C.E., Marshall, R.A., Puglisi, J.D. (2008) An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophysical Journal*, **94** (5), 1826–1835.
- 33 Vogelsang, J., Kasper, R., Steinhauer, C., Person, B., Heilemann, M., Sauer, M., Tinnefeld, P. (2008) A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes. *Angewandte Chemie International Edition*, **47** (29), 5465–5469.
- 34 Förster, T. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.*, **437** (1-2), 55–75.
- 35 Dahan, M., Deniz, A.A., Ha, T., Chemla, D.S., Schultz, P.G., Weiss, S. (1999) Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules. *Chemical Physics*, **247** (1), 85–106.

- 36 Deniz, A.A., Dahan, M., Grunwell, J.R., Ha, T., Faulhaber, A.E., Chemla, D.S., Weiss, S., Schultz, P.G. (1999) Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Forster distance dependence and subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96** (7), 3670–3675.
- 37 Dale, R.E., Eisinger, J., Blumberg, W.E. (1979) The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophysical Journal*, **26** (2), 161–193.
- 38 Ha, T., Enderle, T., Ogletree, D.F., Chemla, D.S., Selvin, P.R., Weiss, S. (1996) Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93** (13), 6264–6268.
- 39 Drude, P. (1900) Zur Elektronentheorie der Metalle. *Ann. Phys.*, **306** (3), 566–613.
- 40 Drude, P. (1900) Zur Elektronentheorie der Metalle; II. Teil. Galvanomagnetische und thermomagnetische Effecte. *Ann. Phys.*, **308** (11), 369–402.
- 41 Sommerfeld, A. and Bethe, H.A. (1967) *Elektronentheorie der Metalle*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- 42 Nanocomposix.eu · Gold Nanoparticles: Optical Properties. <https://nanocomposix.eu/pages/gold-nanoparticles-optical-properties#size> (18 July 2017).
- 43 Sönnichsen, C. (2001) *Plasmons in metal nanostructures*, Zugl.: München, Univ., Diss., 2001, 1st edn, Cuvillier, Göttingen.
- 44 Pinchuk, A., Plessen, G.v., Kreibig, U. (2004) Influence of interband electronic transitions on the optical absorption in metallic nanoparticles. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **37** (22), 3133.
- 45 Coronado, E.A., Encina, E.R., Stefani, F.D. (2011) Optical properties of metallic nanoparticles: manipulating light, heat and forces at the nanoscale. *Nanoscale*, **3** (10), 4042–4059.
- 46 Bohren, C.F. and Huffman, D.R. (1998) *Absorption and scattering of light by small particles*, Wiley, New York.
- 47 Johnson, P.B. and Christy, R.W. (1972) Optical Constants of the Noble Metals. *Phys. Rev. B*, **6** (12), 4370–4379.
- 48 Nanocomposix.eu · Tools. <https://nanocomposix.eu/pages/tools> (21 July 2017).
- 49 Mie, G. (1908) Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.*, **330** (3), 377–445.
- 50 Fröhlich, H. (1950) *Theory of dielectrics: Dielectric constant and dielectric loss*, Oxford Univ. Pr, London.
- 51 Wikipedia Codes for electromagnetic scattering by spheres - Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=783494432> (22 July 2017).
- 52 Mock, J.J., Barbic, M., Smith, D.R., Schultz, D.A., Schultz, S. (2002) Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics*, **116** (15), 6755–6759.
- 53 Myroshnychenko, V., Rodríguez-Fernández, J., Pastoriza-Santos, I., Funston, A.M., Novo, C., Mulvaney, P., Liz-Marzán, L.M., García de Abajo, F.J. (2008) Modelling the optical response of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, **37** (9), 1792–1805.
- 54 Möller, F.M., Holzmeister, P., Sen, T., Acuna, G.P., Tinnefeld, P. (2013) Angular modulation of single-molecule fluorescence by gold nanoparticles on DNA origami templates. *Nanophotonics*, **2** (3).
- 55 Bharadwaj, P. and Novotny, L. (2007) Spectral dependence of single molecule fluorescence enhancement. *Opt. Express*, **15** (21), 14266.
- 56 Härtling, T., Reichenbach, P., Eng, L.M. (2007) Near-field coupling of a single fluorescent molecule and a spherical gold nanoparticle. *Opt. Express*, **15** (20), 12806.
- 57 Seeman, N.C. (1982) Nucleic acid junctions and lattices. *Journal of Theoretical Biology*, **99** (2), 237–247.



- 58 Holliday, R. (1964) A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetics Research*, **5** (02), 282–304.
- 59 Lilley, D.M. (2000) Structures of helical junctions in nucleic acids. *Quarterly reviews of biophysics*, **33** (2), 109–159.
- 60 Kallenbach, N.R., Ma, R.-I., Seeman, N.C. (1983) An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature*, **305** (5937), 829–831.
- 61 Bustamante, C., Marko, J.F., Siggia, E.D., Smith, S. (1994) Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science (New York, N.Y.)*, **265** (5178), 1599–1600.
- 62 Cluzel, P., Lebrun, A., Heller, C., Lavery, R., Viovy, J.L., Chatenay, D., Caron, F. (1996) DNA: an extensible molecule. *Science (New York, N.Y.)*, **271** (5250), 792–794.
- 63 Douglas, S.M., Dietz, H., Liedl, T., Hogberg, B., Graf, F., Shih, W.M. (2009) Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, **459** (7245), 414–418.
- 64 Douglas, S.M., Marblestone, A.H., Teerapittayanon, S., Vazquez, A., Church, G.M., Shih, W.M. (2009) Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno. *Nucleic acids research*, **37** (15), 5001–5006.
- 65 Dietz, H., Douglas, S.M., Shih, W.M. (2009) Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science (New York, N.Y.)*, **325** (5941), 725–730.
- 66 Kosa, P.F., Ghosh, G., DeDecker, B.S., Sigler, P.B. (1997) The 2.1-Å crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein/transcription factor (II)B core/TATA-box. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94** (12), 6042–6047.
- 67 Littlefield, O., Korkhin, Y., Sigler, P.B. (1999) The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96** (24), 13668–13673.
- 68 Lee, N.K., Kapanidis, A.N., Wang, Y., Michalet, X., Mukhopadhyay, J., Ebright, R.H., Weiss, S. (2005) Accurate FRET Measurements within Single Diffusing Biomolecules Using Alternating-Laser Excitation. *Biophysical Journal*, **88** (4), 2939–2953.
- 69 Eggeling, C., Berger, S., Brand, L., Fries, J.R., Schaffer, J., Volkmer, A., Seidel, C. (2001) Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection. *Journal of Biotechnology*, **86** (3), 163–180.
- 70 Nir, E., Michalet, X., Hamadani, K.M., Laurence, T.A., Neuhauser, D., Kovchegov, Y., Weiss, S. (2006) Shot-noise limited single-molecule FRET histograms: comparison between theory and experiments. *The journal of physical chemistry. B*, **110** (44), 22103–22124.
- 71 Tomov, T.E., Tsukanov, R., Masoud, R., Liber, M., Plavner, N., Nir, E. (2012) Disentangling subpopulations in single-molecule FRET and ALEX experiments with photon distribution analysis. *Biophysical Journal*, **102** (5), 1163–1173.
- 72 McKinney, S.A., Joo, C., Ha, T. (2006) Analysis of single-molecule FRET trajectories using hidden Markov modeling. *Biophysical Journal*, **91** (5), 1941–1951.
- 73 Steinhauer, C., Jungmann, R., Sobey, T.L., Simmel, F.C., Tinnefeld, P. (2009) DNA Origami as a Nanoscopic Ruler for Super-Resolution Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, **48** (47), 8870–8873.
- 74 Vietz, C., Lalkens, B., Acuna, G.P., Tinnefeld, P. (2016) Functionalizing large nanoparticles for small gaps in dimer nano-antennas. *New J. Phys.*, **18** (4), 45012.
- 75 Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., Mucic, R.C., Storhoff, J.J. (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, **382** (6592), 607–609.
- 76 Prinz, J., Heck, C., Ellerik, L., Merk, V., Bald, I. (2016) DNA origami based Au-Ag-core-shell nanoparticle dimers with single-molecule SERS sensitivity. *Nanoscale*, **8** (10), 5612–5620.

- 77 Ortiz-Lombardia, M., Gonzalez, A., Eritja, R., Aymami, J., Azorin, F., Coll, M. (1999) Crystal structure of a DNA Holliday junction. *Nature structural biology*, **6** (10), 913–917.
- 78 Schulz, S. (2016) Konformationelle Änderungen der archaeellen RNA Polymerase während des Transkriptionszyklus: Conformational changes of the archaeal RNA polymerase throughout the transcription cycle.
- 79 Foerster-radius of selected ATTO-Dye Pairs in Å (1 Å = 0.1 nm). [https://www.atto-tec.com/fileadmin/user\\_upload/Katalog\\_Flyer\\_Support/ROValues.pdf](https://www.atto-tec.com/fileadmin/user_upload/Katalog_Flyer_Support/ROValues.pdf).
- 80 Brousmiche, D.W., Serin, J.M., Fréchet, J.M.J., He, G.S., Lin, T.-C., Chung, S.-J., Prasad, P.N., Kannan, R., Tan, L.-S. (2004) Fluorescence Resonance Energy Transfer in Novel Multiphoton Absorbing Dendritic Structures †. *J. Phys. Chem. B*, **108** (25), 8592–8600.
- 81 Lee, S., Lee, J., Hohng, S. (2010) Single-molecule three-color FRET with both negligible spectral overlap and long observation time. *PLoS one*, **5** (8), e12270.
- 82 Castro, C.E., Kilchherr, F., Kim, D.-N., Shiao, E.L., Wauer, T., Wortmann, P., Bathe, M., Dietz, H. (2011) A primer to scaffolded DNA origami. *Nature Methods*, **8** (3), 221–229.
- 83 Stein, I.H., Schüller, V., Böhm, P., Tinnefeld, P., Liedl, T. (2011) Single-molecule FRET ruler based on rigid DNA origami blocks. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, **12** (3), 689–695.
- 84 Atto-Tec GmbH Product Information: ATTO 647N. [http://www.atto-tec.com/fileadmin/user\\_upload/Katalog\\_Flyer\\_Support/ATTO\\_647N.pdf](http://www.atto-tec.com/fileadmin/user_upload/Katalog_Flyer_Support/ATTO_647N.pdf) (2 July 2017).
- 85 BBI Solutions Gold Nanoparticle Specifications - Nanoparticles - Gold - Technical Support. <https://www.bbi-solutions.com/technical-support/gold/nanoparticles/gold-nanoparticle-specifications.html> (3 July 2017).
- 86 Vietz, C., Kaminska, I., Sanz Paz, M., Tinnefeld, P., Acuna, G.P. (2017) Broadband Fluorescence Enhancement with Self-Assembled Silver Nanoparticle Optical Antennas. *ACS Nano*, **11** (5), 4969–4975.
- 87 Lee, Y.-J., Schade, N.B., Sun, L., Fan, J.A., Bae, D.R., Mariscal, M.M., Lee, G., Capasso, F., Sacanna, S., Manoharan, V.N., Yi, G.-R. (2013) Ultraspherical, highly spherical monocrystalline gold particles for precision plasmonics. *ACS Nano*, **7** (12), 11064–11070.
- 88 Nanocomposix.eu · Aqueous Gold Spheres. <https://nanocomposix.eu/collections/gold-spheres> (9 July 2017).
- 89 Niu, J., Zhu, T., Liu, Z. (2007) One-step seed-mediated growth of 30–150 nm quasispherical gold nanoparticles with 2-mercaptopropionic acid as a new reducing agent. *Nanotechnology*, **18** (32), 325607.
- 90 Schmied, J.J., Raab, M., Forthmann, C., Pibiri, E., Wünsch, B., Dammeyer, T., Tinnefeld, P. (2014) DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy. *Nat. Protocols*, **9** (6), 1367–1391.
- 91 Refractive index of Au (Gold) - Johnson. <https://refractiveindex.info/?shelf=main&book=Au&page=Johnson> (1 June 2017).

## 9. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER A) KRAFTSPEKTROSKOPIE, B) OPTISCHEN PINZETTE UND C) MOLEKULAREN KRAFTKLAMMER (VERÄNDERT NACH [3]).	8
ABBILDUNG 2: A) LICHTSAMMELKOMPLEX DER PURPURBAKTERIEN (VERÄNDERT NACH [14]). B) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES RECHTECKIGEN DNA-ORIGAMIS MIT SECHS RINGFÖRMIG ANGEORDNETEN DONOREN UND EINEM AKZEPTOR IN DEREN ZENTRUM.	10
ABBILDUNG 3: DARSTELLUNG DES RELEVANTEN KONZENTRATIONSBEREICHS FÜR BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN. DIE EINZELMOLEKÜLSPEKTROSKOPIE LIEGT IM PIKOMOLAREN BIS IN DEN NIEDRIGEN NANOMOLAREN BEREICH. FÜR DIE DIAGNOSTIK HINGEGEN WERDEN KONZENTRATIONEN WEIT UNTER EINEM PIKOMOLAR BENÖTIGT. DIES WÄRE FÜR EINZELMOLEKÜLMESSUNGEN DEUTLICH ZU ZEITAUFWÄNDIG. DEMGEGENÜBER STEHEN DIE SEHR HOHEN BENÖTIGTEN KONZENTRATIONEN FÜR DIE UNTERSUCHUNG BIOLOGISCHER INTERAKTIONEN. DIES IST MIT EINZELMOLEKÜLMIKROSKOPIE UNMÖGLICH ZU MESSEN, DA DIE PROBEN STARK VERDÜNNT WERDEN MÜSSTEN, UM ZU GEWÄHRLEISTEN, DASS SICH IMMER NUR EIN MOLEKÜL PRO ZEITEINHEIT IM ANREGUNGSVOLUMEN BEFINDET. (VERÄNDERT NACH [18]).	11
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER A) DNA-SEQUENZIERUNG DURCH EINE DNA-POLYMERASE IN EINER NANOAPERTUR (VERÄNDERT NACH [19]), B) „BOWTIE“ NANOANTENNE (VERÄNDERT NACH [22]), C) NANOANTENNE IN DER NANOAPERTUR (VERÄNDERT NACH [23]) UND D) DNA-ORIGAMI NANOANTENNE (VERÄNDERT NACH [24]).	12
ABBILDUNG 5: A) DUNKELFELDAUFNAHME VON DER NANOANTENNE MIT 60 NM GROßEN GOLD-NANOPARTIKELN. DIE PFEILE MARKIEREN JEWEILS EIN MONOMER (OBEN) UND EIN DIMER (UNTEN). B) FLUORESCENZBILD DER GLEICHEN OBERFLÄCHE. C) KORRELATION DER DUNKELFELDAUFNAHME UND DES FLUORESCENZBILDES. SKALA: 5µM.	14
ABBILDUNG 6: JABLONSKI-DIAGRAMM FÜR ORGANISCHE FARBSTOFFMOLEKÜLE. DIE ROTATIONSLEVEL WURDEN ZUR ÜBERSICHTLICHKEIT NICHT MIT AUFGENOMMEN. DIE ENERGIELEVELS DER RADIKALZUSTÄNDE SIND JE NACH FARBSTOFF UNTERSCHIEDLICH HOCH. DIE ÜBERGÄNGE UNTER ABSORPTION (BLAU, GRÜN) UND EMISSION VON PHOTONEN (ORANGE, ROT) SIND MIT DURCHGEZOGENEN LINIEN DARGESTELLT, WOHINGEGEN DIE STRAHLUNGSLOSEN ÜBERGÄNGE DURCH GESTRICHELTE LINIEN DARGESTELLT WERDEN.	16
ABBILDUNG 7: ENZYMATISCHER SAUERSTOFFENTZUG MIT GLUCOSEOXIDASE UND KATALASE.	17
ABBILDUNG 8: A) JABLONSKI-DIAGRAMM DES FÖRSTER-RESONANZ-ENERGIE-TRANSFERS. B) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ABHÄNGIGKEIT DER FLUORESCENZINTENSITÄT DES DONORS (GRÜN) UND DES AKZEPTORS (ROT) VON DEM ABSTAND ZWISCHEN IHNEN ( $R_N$ ). C) DIE FRET-EFFIZIENZ HÄNGT DIREKT VON DEM ABSTAND ZWISCHEN DEM DONOR UND DEM AKZEPTOR AB. DER ABSTAND, BEI DEM DIE FRET-EFFIZIENZ 0,5 BETRÄGT IST DER FÖRSTER-RADIUS. D) DARSTELLUNG DER ÜBERLAPPUNG DES EMISSIONSSPEKTRUMS EINES DONORS MIT DEM ABSORPTIONSSPEKTRUM EINES AKZEPTORS UND DES DARAUS BERECHNETEN ÜBERLAPPINTEGRALS J.	18
ABBILDUNG 9: WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN ELEKTROMAGNETISCHER STRAHLUNG UND METALLISCHEN NANOPARTIKELN.	20
ABBILDUNG 10: LÖSUNGEN VON GOLD- UND SILBER-NP VON 5 NM BIS 100 NM DURCHMESSER, VERÄNDERT NACH [42].	21

ABBILDUNG 11: NACH DER ANREGUNG DES MNP MIT ELEKTROMAGNETISCHER STRAHLUNG KANN DIESES DIE AUFGENOMMENE ENERGIE ENTWEDER RADIATIV IN FORM VON LICHT ABGEBEN (LINKS) ODER NICHT-RADIATIV ÜBER DIE BILDUNG EINES ELEKTRON-LOCH-PAARES (RECHTS). DABEI GIBT ES ZWEI MÖGLICHE WEGE. ENTWEDER DIE INTRABANDANREGUNG INNERHALB DES LEITUNGSBANDES ODER DIE INTERBANDANREGUNG AUS DEM TIEFER LIEGENDEN D-BAND IN DAS LEITUNGSBAND, ABBILDUNG VERÄNDERT NACH [43].	22
ABBILDUNG 12: VERGLEICH DER STREUSPEKTREN EINES MNP UND DER EMISSIONSSPEKTREN EINES FLUORESZIERENDEN FARBSTOFFMOLEKÜLS BEI ANREGUNG MIT A) EINER WELLENLÄNGE UND B) EINEM GESAMTEN SPEKTRALBEREICH.	23
ABBILDUNG 13: DARSTELLUNG DER NACH RAYLEIGH (SCHWARZ) UND MIE (BLAU) KALKULIERTEN ABSORPTIONSQUERSCHNITTE FÜR GOLD-NP MIT EINEM DURCHMESSER VON 5 NM (A), 50 NM (B) UND 100 NM (C). D) AUFTRAGUNG DER ERHALTENEN RESONANZWELLENLÄNGE GEGEN DEN DURCHMESSER DER GOLD-NP FÜR DIE BERECHNUNGEN NACH RAYLEIGH (SCHWARZ) UND MIE (BLAU).	24
ABBILDUNG 14: A) DIPOLMODE IN EINEM MNP. B) QUADRUPOLMODE IN EINEM NP. C) EXTINKTIONSEFFIZIENZEN EINER 200 NM GROßEN SILBERKUGEL FÜR JEDE MULTIPOLMODE $J = 1, 2, 3$ UND DIE GESAMTEXTINKTIONSEFFIZIENZ IN VAKUUM, VERÄNDERT NACH [45].	25
ABBILDUNG 15: A) EINFLUSS DES BRECHUNGSINDEX DES UMGEBENDEN MEDIUMS AUF DIE RESONANZENERGIE UND DIE BREITE DES STREUSPEKTRUMS EINES GOLDPARTIKELS DER GRÖßE VON 20 NM. B) EINFLUSS DES PARTIKELDURCHMESSERS AUF DIE RESONANZENEGIE UND DIE BREITE DES STREUSPEKTRUMS VON GOLD-NP BEI EINEM UMGEBENDEN MEDIUM MIT EINEM BRECHUNGSINDEX VON 1,5. DIE WERTE WURDEN VON CARSTEN SÖNNICHSEN MIT DER MIE-THEORIE BERECHNET. [VERÄNDERT NACH C. SÖNNICHSEN [43]].	26
ABBILDUNG 16: A) TEM-AUFNAHMEN VON DREI VERSCHIEDENEN SILBER-NP. B) DARSTELLUNG DER GEMESSENEN STREUSPEKTREN DER SILBER-NP AUS (A), VERÄNDERT NACH [52].	26
ABBILDUNG 17: DARSTELLUNG DER HYBRIDISIERUNG DER PLASMONEN BEI DER KOPPLUNG ZWEIER IDENTISCHER MNP FÜR A) DIE LONGITUDINALE POLARISATION UND B) DIE TRANSVERSALE POLARISATION. BEI DER LONGITUDINALEN POLARISATION BEFINDET SICH DER VEKTOR DES ELEKTRISCHEN FELDES PARALLEL ZUM VERBINDUNGSVEKTOR ZWISCHEN DEN BEIDEN MNP UND BEI DER TRANSVERSALEN POLARISATION SENKRECHT DAZU. DIE BLAUEN PFEILE ZEIGEN DIE POLARISATIONEN DER MNP AN. DIE STERNE MARKIEREN DIE DIPOLE, DIE OPTISCH AKTIV SIND. VERÄNDERT NACH [53].	27
ABBILDUNG 18: A) INTENSITÄT DES ELEKTRISCHEN FELDES UM EIN 80 NM GROßES GOLD-NP, ÜBERNOMMEN AUS [54]. DIE GEPUNKTETE LINIE STELLT EINEN ABSTAND VON 12,2 NM ZUR OBERFLÄCHE DES GOLD-NP DAR. B) VEREINFACHTES JABLONSKI-SCHEMA FÜR DIE ÜBERGÄNGE INNERHALB EINES FARBSTOFFMOLEKÜLS IN UNMITTELBARER NÄHE EINES MNP. C) ÄNDERUNG DER RADIATIVEN UND DER NICHT-RADIATIVEN RATE IN ABHÄNGIGKEIT VOM ABSTAND ZWISCHEN EINEM 80 NM GROßEN GOLD-NP UND EINEM FARBSTOFFMOLEKÜLBERECHNET NACH GLEICHUNG(24) [55].	28
ABBILDUNG 19: A) ANREGUNGSRATENVERSTÄRKUNG (ROT) UND QUANTENAUSBEUTE (BLAU) ALS FUNKTION DES ABSTANDS ZWISCHEN EINEM 80 NM GROßEN GOLD-NP UND EINEM FARBSTOFF MIT EINER QUANTENAUSBEUTE VON 1. B) VERSTÄRKUNG DER EMISSIONSRATE ALS FUNKTION DES ABSTANDS FÜR UNTERSCHIEDLICHE DURCHMESSER DER GOLD-NP. ANREGUNGSWELLENLÄNGE LIEGT BEI 650 NM. C) FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR SILBER UND GOLD (JE 80 NM) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER WELLENLÄNGE BEI EINEM ABSTAND VON 10 NM	

ZWISCHEN DEM PARTIKEL UND DEM FARBSTOFF. D) FLUORESCENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DEM ABSTAND BEI EINER FESTEN ANREGUNGSWELLENLÄNGE VON 488 NM. DIE QUANTENAUSBEUTE DES FARBSTOFFMOLEKÜLS BETRÄGT IN ALLEN VIER GRAPHEN $Q \sim 1$ . ABBILDUNGEN VERÄNDERT NACH [25, 55].	30
ABBILDUNG 20: NORMIERTE ANREGUNGSRATENÄNDERUNG (ROT, GEPUNKTET), NORMIERTE FLUORESCENZRATENÄNDERUNG (SCHWARZ) UND QUANTENAUSBEUTE (BLAU, GEPUNKTET) IN ABHÄNGIGKEIT VOM ABSTAND ZWISCHEN EINEM 80 NM GROßEN GOLD-NP UND EINEM DIPOL (FARBSTOFF) MIT $Q = 1$ . DIE ANREGUNGSWELLENLÄNGE IST $\lambda_{\text{exc}} = 532$ NM UND DIE DIPOLEMISSION BEI IST $\lambda_{\text{em}} = 560$ NM. A-C) STELLEN DIE UNTERSCHIEDLICHEN ORIENTIERUNGEN DES DIPOLS ZUM ELEKTRISCHEN FELD UM DAS GOLD-NP DAR. Y IST DIE AUSBREITUNGSRICHTUNG DES LICHTS UND X DIE RICHTUNG DES ELEKTRISCHEN FELDES. VERÄNDERT NACH [56].	31
ABBILDUNG 21: A) DARSTELLUNG DER EINZELNEN KOMPONENTEN EINER DNA-DOPPELHELIX. B) ABSTÄNDE IN EINEM DNA-STRANG.	32
ABBILDUNG 22: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ABSTÄNDE DER FARBSTOFFMOLEKÜLE IN ABHÄNGIGKEIT VON IHRER POSITION AUF DER DNA. DER ABSTAND ZWISCHEN DEM ROTEN UND DEM GRÜNEN MOLEKÜL WIRD GUT ÜBER 0,34·N ANGENÄHERT WOHINGEGEN DER ABSTAND ZUM GELBEN MOLEKÜL DEUTLICH WEITER IST AUFGRUND DER WINDUNG DER DOPPELHELIX.	33
ABBILDUNG 23: A UND B) ZYLINDER-MODELL ZUR BERECHNUNG DES ABSTANDS ZWEIER FARBSTOFFMOLEKÜLE AN EINEM DNA-STRANG. C) BERECHNETER ABSTAND ZWISCHEN DEN BEIDEN FARBSTOFFMOLEKÜLEN IN BEZUG AUF DIE ANZAHL AN BASENPAAREN ZWISCHEN DEN FARBSTOFFMOLEKÜLEN. DIE BLAUE GERADE IST DER EINFACHE ZUSAMMENHANG $N \cdot 0,34$ NM, WOHINGEGEN DIE SCHWARZE UND DIE ROTE KURVE DIE ABSTÄNDE BERECHNET MIT DEM ZYLINDER-MODELL DARSTELLEN.	33
ABBILDUNG 24: DIE ZWEI KONFORMERE DER HOLLIDAY JUNCTION, DIE BEI MAGNESIUMCHLORID ÜBER DEN OFFENEN QUADRATISCHEN ZUSTAND DYNAMISCH IHRE KONFORMATION WECHSELN.	34
ABBILDUNG 25: A) SYNTHESE EINER DREIECKIGEN DNA-STRUKTUR AUS DREI GLEICHLANGEN DNA-SEQUENZEN. B) SYNTHESE EINES DNA-ORIGAMIS AM BEISPIEL EINES RECHTECKIGEN DNA-ORIGAMIS. ZUNÄCHST WERDEN DER GERÜSTSTRANG UND DIE HEFTSTRÄNGE IN EINEM MIKROREAKTIONSGEFÄß GEMISCHT UND ERHITZT. BEIM ABKÜHLEN BINDEN DIE HEFTSTRÄNGE AN DEN KOMPLEMENTÄREN BEREICH DES GERÜSTSTRANGES. C) AUFBAU EINES ZWEIDIMENSIONALEN DNA-ORIGAMIS NACH P. ROTHMUND [12] UND EINES DREIDIMENSIONALEN DNA-ORIGAMIS NACH S. DOUGLAS [63].	35
ABBILDUNG 26: DARSTELLUNG DER KRISTALLSTRUKTUR DES TATA-BOX BINDENDEN PROTEINS (TBP): PROTEIN DATABASE (2Z8U).	36
ABBILDUNG 27: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DES MIKROSKOP-AUFBAUS FÜR ZEITAUFGELÖSTE EINZELPHOTONENMESSUNGEN, SOWIE DUNKELFELD-SPEKTROSKOPIE. PM: POLARISATIONSERHALTENDE FASER, NDF: NEUTRALDICHTEFILTER, FK: FASEREINKOPPLER, LP: LINEARPOLARISATOR, DS: DICHROITISCHER STRAHLENTEILER, L: LINSE, F: FILTER, B: LOCHBLENDE, EOM: ELEKTRO-OPTISCHER MODULATOR, AOTF: AKUSTO-OPTISCHER FILTER.	37
ABBILDUNG 28: A) FUNKTIONSWEISE EINES KONFOKALEN MIKROSKOPS. B) FUNKTIONSWEISE EINES DUNKELFELDMIKROSKOPS.	39

ABBILDUNG 29: A) HISTOGRAMME DER PIXELPOSITIONEN AUF DER KAMERA ZU DEN VIER VERWENDETEN LASERWELLENLÄNGEN. B) LINEARE REGRESSION DER LASERWELLENLÄNGE GEGEN DIE POSITION AUF DER KAMERA.....	40
ABBILDUNG 30: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DES ZWEI-FARBEN-MIKROSKOP-AUFBAUS FÜR FRET-MESSUNGEN. PM: POLARISATIONSERHALTENDE FASER, NDF: NEUTRALDICHTEFILTER, FK: FASEREINKOPPLER, LP: LINEARPOLARISATOR, DS: DICHROITISCHER STRAHLENTEILER, L: LINSE, F: FILTER, B: LOCHBLENDE, AOTF: AKUSTO-OPTISCHER FILTER.....	41
ABBILDUNG 31: FLUORESCENZLEBENSDAUER-AUSWERTUNG. OBEN: DURCH EINE ENTFALTUNG MIT DER IRF (BLAU) IN FLUOFIT KANN AUS DER GEMESSENEN FLUORESCENZLEBENSDAUERKURVE (SCHWARZ) DIE ENTFALTETE KURVE (ROT) ERHALTEN WERDEN. AUS DIESER WIRD DIE FLUORESCENZLEBENSDAUER (3,5 NS FÜR ATTO647N) EXTRAHIERT. ....	42
ABBILDUNG 32: BEISPIEL FÜR DIE ANWENDUNG DES FRET-2CDE-FILTERS. A) UNTERSCHIEDLICHE STATISCHE POPULATIONEN. B) ZWEI DYNAMISCHE POPULATIONEN. SCHWARZE LINIE: BURSTS, TÜRKIS: BURSTS NACH DEM FILTERN FÜR FRET-2CDE<11, GRAU: BURSTS NACH DEM FILTERN FÜR FRET-2CDE>11. ABBILDUNG VERÄNDERT UND ÜBERNOMMEN VON [71].....	46
ABBILDUNG 33: BEISPIEL FÜR DIE ANWENDUNG DES ALEX-2CDE-FILTERS. A) E-S-PLOT VOR DER KORREKTUR. B) ALEX-2CDE-FILTER. C) E-S-PLOT NACH DER KORREKTUR MIT ALEX-2CDE<4. ABBILDUNG VERÄNDERT UND ÜBERNOMMEN VON [71].....	47
ABBILDUNG 34: A) ANWENDUNG DES HIDDEN MARKOV MODELS AUF DIE INTENSITÄTS-ZEIT-SPUREN VON EINER HOLLIDAY JUNCTION MIT CY3/CY5. OBEN: INTENSITÄT DES DONORS (GRÜN, $I_D^D$ ) UND DES AKZEPTORS (ROT, $I_A^A$ ) BEI DONOR-ANREGUNG. UNTEN: FRET-EFFIZIENZ PRO ZEITEINHEIT (BLAU) UND ANNÄHERUNG MIT HIDDEN MARKOV MODEL (SCHWARZ). B) HISTOGRAMME ÜBER DIE VERWEILDAUERN DES MOLEKÜLS AUS A). C) HISTOGRAMME ÜBER DIE VERWEILDAUER ALLER MOLEKÜLE DER MESSUNG FÜR DEN ÜBERGANG VON HOHER FRET-EFFIZIENZ ZU NIEDRIGER UND UMGEKEHRT, ANGEPASST MIT EINEM MONOEXPONENTIELLEN FIT (ROT)....	48
ABBILDUNG 35: A) PRINZIP DER DUNKELFELD-MIKROSKOPIE-AUFNAHME MIT DEM SPEKTROMETER UND DER KAMERA. B) SPEKTRALE AUFTRENNUNG EINES EINZELBILDES. C) DARSTELLUNG DER ZEITLICHEN DETEKTION DER EINZELBILDER. D) NACH ZUSAMMENFÜGEN ALLER EINZELBILDER ERHALTENES GESAMTBILD. E) GEMITTELTES SPEKTRUM ÜBER MEHRERE PIXEL AUS D). ....	49
ABBILDUNG 36: AUSWERTUNG DER KOMBINIERTEN DUNKELFELD- UND KONFOKALEN MESSUNG IN DF_CF_ANALYSIS.VI. ÜBEREINANDERGELEGTES BILD AUS DER DUNKELFELD- UND DER KONFOKALEN MESSUNG. 20X20 $\mu$ M. ....	51
ABBILDUNG 37: INTENSITÄTS-ZEIT-SPUR VON ATTO647N AN EINER SÄULENFÖRMIGEN DNA-STRUKTUR MIT 60 NM GOLD-NP (SCHWARZ). DIE FREQUENZ DES EOM LIEGT BEI 10 HZ. IN ROT IST DER ANGEPASSTE SINUS-FIT ZU SEHEN.....	51
ABBILDUNG 38 AMPLITUDENKORREKTUR FÜR 60 NM GOLD-NP AN DER DNA-ORIGAMI NANOANTENNE. A) 30° GEGEN 0°, KORREKTURFAKTOR: 0,887, B) 60° GEGEN 0°, KORREKTURFAKTOR: 0,601 C) 90° GEGEN 0°, KORREKTURFAKTOR: 0,392. ....	52

ABBILDUNG 39: KORREKTUR DES SPEKTRUMS EINES 60 NM GOLD-NP AN EINER SÄULENFÖRMIGEN DNA-ORIGAMI NANOANTENNE. A) SPEKTRUM VOR DER KORREKTUR BEI UNTERSCHIEDLICHEN POLARISATIONEN. B) SPEKTRUM NACH DER KORREKTUR BEI UNTERSCHIEDLICHEN POLARISATIONEN. ....	52
ABBILDUNG 40: GEL-ELEKTROPHORESE VON RECHTECKIGEN DNA-ORIGAMI NACH DER FALTUNG. ....	54
ABBILDUNG 41: A) LABTEK™-KAMMER. B) PRÄPARATION EINER FLUSSKAMMER. ....	56
ABBILDUNG 42: BSA-BIOTIN-OBERFLÄCHE ZUR ANBINDUNG VON DNA-ORIGAMI ÜBER NEUTRAVIDIN. ....	56
ABBILDUNG 43: GEL-AUFTRENNUNG DER MNP-DNA MONOMERE UND DIMERE. ....	57
ABBILDUNG 44: PDB-DARSTELLUNG DER KRAFTKLAMMER-STRUKTUR VON VORNE (A) UND VON DER SEITE (B). C, D) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KRAFTKLAMMER. DIE GESAMTLÄNGE BETRÄGT 80,90 NM UND DIE LÄNGE DES BEREICHS ZWISCHEN DEN KLAMMERN 42,84 NM. RECHTS UND LINKS BEFINDEN SICH DIE RESERVOIRS AN GERÜSTSTRANG. DIE GRÜN EINGEFÄRBTEN BEREICHE STELLEN DIE ZEHN HEFTSTRÄNGE DAR, DIE DURCH AUSTAUSCH DIE KRAFT VERÄNDERN. UM DIE KRAFT ZU ERHÖHEN WERDEN TEILE DES GERÜSTSTRANGS AUS DER ENTROPISCHEN FEDER ENTFERNT UND IM RESERVOIR GESPEICHERT (D). ....	59
ABBILDUNG 45: A) DARSTELLUNG DER NANOSKOPISCHEN KRAFTKLAMMER MIT DEM GERÜSTSTRANG DER LÄNGE VON 7249 NUKLEOTIDEN. DER EINZELSTRÄNGIGE BEREICH IST 42,84 NM LANG, VORGEGEBEN DURCH DEN ABSTAND ZWISCHEN DEN BEIDEN FESTEN SEITENTEILEN. B) KRAFT ALS FUNKTION VON DER ANZAHL AN BASEN IN DER FEDER. DER TRANSPARENTE BLAUE BEREICH IST DER FEHLERBEREICH, DER DURCH DIE STANDARDABWEICHUNG DER EINZELNEN BASENLÄNGEN ZUSTANDE KOMMT. ....	60
ABBILDUNG 46: A) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DNA-ORIGAMI KRAFTKLAMMER MIT HOLLIDAY JUNCTION. $D_{HJ}$ STELLT DIE BREITE DER EINZELSTRÄNGIGEN DNA DAR NACH ABZUG DER HOLLIDAY JUNCTION VON DER BREITE DER ÖFFNUNG. DIE HOLLIDAY JUNCTION BEFINDET SICH IN DER OFFENEN KONFORMATION SOLANGE, BIS AUSREICHEND MAGNESIUMCHLORID VORHANDEN IST. DIESES FÜHRT DAZU, DASS SIE ZWISCHEN DEN KONFORMATIONEN ISO-I UND ISO-II WECHSELT. IN B) SIND DIE WINKEL AUFGETRAGEN, DIE DIE HOLLIDAY JUNCTION EINNEHMEN KANN, SOWIE AUCH DIE DARAUS RESULTIERENDEN ABSTÄNDE ZWISCHEN DEN FARBSTOFFMOLEKÜLEN. C) AUFTRAGUNG DER RESULTIERENDEN KRAFT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ANZAHL AN BASEN IN DER SSDNA FEDER FÜR DIE OFFENE KONFORMATION. DER TRANSPARENTE BLAUE BEREICH IST DER FEHLERBEREICH, DER DURCH DIE STANDARDABWEICHUNG DER EINZELNEN BASENLÄNGEN ZUSTANDE KOMMT. D) DER WECHSEL ZWISCHEN DEN BEIDEN KONFORMATIONEN FÜHRT ZU EINER VERÄNDERUNG DES ABSTANDS $D_{HJ}$ . DIE AUSWIRKUNG AUF DIE KRAFT IN BEZUG AUF DEN ABSTAND IST DARGESTELLT. ....	62
ABBILDUNG 47: A) IMMOBILISIERUNG DER DNA-ORIGAMI-KRAFTKLAMMER AUF EINER BSA-BIOTIN-OBERFLÄCHE. B) BEISPIEL EINER INTENSITÄTS-ZEIT-SPUR FÜR EIN MOLEKÜL DER KRAFT VON 0 PN. ROT: AKZEPTOR-DETEKTION NACH AKZEPTOR-ANREGUNG, GELB: AKZEPTOR-DETEKTION NACH DONOR-ANREGUNG, BLAU: DONOR-DETEKTION NACH DONOR-ANREGUNG. ....	62
ABBILDUNG 48: A) AUFTRAGUNG DER STÖCHIOMETRIE-WERTE ALLER MOLEKÜLE GEGEN DIE FRET-EFFIZIENZ FÜR DIE HJ ALLEINE UND IN DER KRAFTKLAMMER BEI 0 PN UND 4 PN. B) AUFTRAGUNG DER FRET-EFFIZIENZ GEGEN DEN ABSTAND ZWISCHEN CY3 UND CY5. EINGETRAGEN WURDEN DIE BERECHNETEN FRET-EFFIZIENZEN FÜR DIE ZUSTÄNDE ISO-I (SCHWARZ) UND ISO-II (ROT) SOWIE DIE GEMESSENEN FRET-EFFIZIENZEN FÜR ISO-I (BLAU) UND ISO-II (GELB). ....	63

ABBILDUNG 49: A) BEISPIELE FÜR KORRIGIERTE FRET-EFFIZIENZ-ZEIT-SPUREN FÜR DIE HOLLIDAY JUNCTION AUßERHALB UND INNERHALB DER KRAFTKLAMMER VON 0 PN BIS 4 PN. B) HISTOGRAMME ÜBER DIE KORRIGIERTEN FRET-EFFIZIENZEN ALLER MOLEKÜLE DER JEWEILIGEN PROBE AUS A). C) AUFTRAGUNG DER ÜBERGANGSRATEN VON ISO-I ZU ISO-II (BLAU) UND ISO-II ZU ISO-I (ROT). DIE FEHLERBALKEN DER KRAFT KOMMEN DURCH DEN STANDARDFEHLER DER EINZELNEN BASENLÄNGEN UND DER KRAFTÄNDERUNG DURCH DIE ABSTANDSÄNDERUNG DURCH DIE KONFORMATIONSÄNDERUNGEN DER HOLLIDAY JUNCTION. DIE Y-FEHLER SIND DIE STANDARDFEHLER DER EXPONENTIELLEN ANPASSUNGSFUNKTIONEN. DIE VERKLEINERTE DARSTELLUNG IN D) STELLT DIE VERGLEICHSWERTE AUS DER PUBLIKATION VON HOHNG ET AL. [1] FÜR DIE HR-JUNCTION DAR.	64
ABBILDUNG 50: VERGLEICH DER HOLLIDAY JUNCTION IN DER DNA-ORIGAMI KRAFTKLAMMER (A) MIT DENEN AUS DEM PAPER VON HOHNG [1] (B).....	64
ABBILDUNG 51: A) SEQUENZ DER TATA-BOX IN DER DNA-ORIGAMI KRAFTKLAMMER. B) PDB-DARSTELLUNG DER TATA-BOX IM GERADEN ZUSTAND UND C) PDB-DARSTELLUNG DER GEKNICKTEN TATA-BOX. DIE PFEILE ZEIGEN DIE BEREICHE AN DENEN DAS TBP AN DIE DNA BINDET.....	65
ABBILDUNG 52: A) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DNA-ORIGAMI-KRAFTKLAMMER OHNE UND MIT TBP. $D_{SSV}$ STELLT DIE BREITE DER EINZELSTRÄNGIGEN DNA DAR NACH ABZUG DER TATA-BOX VON DER BREITE DER ÖFFNUNG. DAS ANBINDEN DES TBP FÜHRT ZU EINER VERLÄNGERUNG DES EINZELSTRÄNGIGEN BEREICHS. B) AUFTRAGUNG DER RESULTIERENDEN KRAFT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ANZAHL AN BASEN IN DER SSDNA FEDER FÜR DIE GERADE DNA. DER TRANSPARENTE BLAUE BEREICH IST DER FEHLERBEREICH, DER DURCH DIE STANDARDABWEICHUNG DER EINZELNEN BASENLÄNGEN ZUSTANDE KOMMT. C) DAS AN- UND ABBINDEN DES TBPS FÜHRT ZU EINER VERÄNDERUNG DES ABSTANDS $D_{SSV}$ . DIE AUSWIRKUNG AUF DIE KRAFT IN BEZUG AUF DEN ABSTAND IST DARGESTELLT. ....	66
ABBILDUNG 53: DARSTELLUNG DER GAMMA- UND BETA-KORRIGIERTEN HISTOGRAMME ÜBER DIE FRET-EFFIZIENZ FÜR DIE PROBE IN DER DNA-ORIGAMI KRAFTKLAMMER OHNE (A) UND MIT (B) TBP UND AUßERHALB DER DNA-ORIGAMI KRAFTKLAMMER MIT TBP (C). D) AUFTRAGUNG DER FRET-EFFIZIENZ GEGEN DEN ABSTAND FÜR ATTO532/ATTO647N. EINGETRAGEN WURDEN DIE BERECHNETEN FRET-EFFIZIENZEN FÜR DIE ZUSTÄNDE GEKNICKT (SCHWARZ) UND GERADE (ROT) SOWIE DIE GEMESSENEN FRET-EFFIZIENZEN FÜR GEKNICKT (BLAU) UND GERADE (GELB). E) SEMI-LOGARITHMISCHE AUFTRAGUNG DER WAHRSCHEINLICHKEIT DES GEKNICKTEN ZUSTANDS $P_{GEKN}$ GEGEN DIE ANGELEGTE KRAFT $F$ . DER FIT ENTSPRICHT DER BOLTZMANN-VERTEILUNG (55). DIE FEHLER SIND STANDARDFEHLER.....	68
ABBILDUNG 54: A) RECHTECKIGES DNA-ORIGAMI MIT SECHS RINGFÖRMIG ANGEORDNETEN DONORMOLEKÜLEN (CY3) UM EINEN AKZEPTORMOLEKÜL (CY5). B) SYNTHETISCHER LICHTSAMMELKOMPLEX AUS SECHS DONORMOLEKÜLEN. C UND D) PROBEN MIT EINEM DONOR UND EINEM KURZEN (D) UND EINEM LANGEN ABSTAND (C). E-H) PROBEN MIT ZWEI DONORMOLEKÜLEN IN UNTERSCHIEDLICHEN GEOMETRIEN. DIE BLAUE VERBINDUNGSLINIE ZWISCHEN DEN MOLEKÜLEN BEZEICHNET DEN KÜRZEREN ABSTAND (5,2 NM) UND DIE ORANGENE VERBINDUNGSLINIE DEN LÄNGEREN ABSTAND (5,6 NM).....	70
ABBILDUNG 55: A) SKIZZEN DER BEIDEN GEMESSENEN KONFIGURATIONEN DER DONORMOLEKÜLE ZUM AKZEPTORMOLEKÜL AUF DEM DNA-ORIGAMI. B) GEMESSENE FRET-EFFIZIENZEN DER PROBEN AUS (A). C) GEMESSENE STÖCHIOMETRIE DER PROBEN AUS (A). B) UND C) SIND GAMMA-KORRIGIERTE WERTE. ....	71



- ABBILDUNG 56: AUS DEN HISTOGRAMMEN IN ABBILDUNG 55 ERHALTENE ERWARTUNGSWERTE INKLUSIVE STANDARDABWEICHUNG FÜR DEN A) ANTENNENEFFEKT, B) DIE STÖCHIOMETRIE UND C) DIE FRET-EFFIZIENZ FÜR DIE ENTSPRECHENDE PROBE. IN GRÜN SIND DIE PROBEN MIT EINEM DONOR, IN ORANGE DIE PROBEN MIT ZWEI DONOREN UND IN BLAU DIE PROBE MIT SECHS DONOREN DARGESTELLT. ....72
- ABBILDUNG 57: ERGEBNISSE DER MESSUNGEN DER AUSGEWÄHLTEN SIEBEN PROBEN MIT DER A) EINZELMOLEKÜL-FRET-MIKROSKOPIE UND DER B) MESSUNG MIT DEM FLUORESZENZSPEKTROMETER, VERÄNDERT NACH [17]. ...72
- ABBILDUNG 58: A) STREUSPEKTREN VON GOLD-NP ZUNEHMENDER GRÖÖE. BLAU: AUS MESSUNG MEHRERER (>30) GOLD-NP GEMITTELTES STREUSPEKTRUM, ROT: SIMULATION. B) AUFTRAGUNG DER AUS (A) ERMITTELTEN PEAK-POSITION DER STREUWELLENLÄNGE MIT STANDARDFEHLER GEGEN DIE PARTIKELGRÖÖE UND DER ENTSPRECHENDEN KURVENANPASSUNG GEMÄÖ GLEICHUNG (59). C) ÖBER MEHRERE MOLEKÖLE (>30) GEMITTELTES STREUSPEKTRUM FÖR 40 NM GOLD-NP MIT (ROT) UND OHNE (BLAU) DNA. D) ÖBER MEHRERE MOLEKÖLE (>30) GEMITTELTES STREUSPEKTRUM FÖR 80 NM GOLD-NP MIT (ROT) UND OHNE (BLAU) DNA.....74
- ABBILDUNG 59: DARSTELLUNG DER POLARISATIONSABHÖNGIGKEIT DER PARTIKEL, A) MONOMER UND C) DIMER. STREUSPEKTREN FÖR DEN MONOMER (B) UND DEN DIMER (D) ZEIGEN UNTERSCHIEDE BEI PARALLELER POLARISATION (ROT) UND SENKRECHTER POLARISATION (BLAU). ....74
- ABBILDUNG 60: A) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES NANOSTÖBCHEN. DIE VON NANOPARTZ FÖR DIE MESSUNG VERWENDETEN GOLD-NANOSTÖBCHEN HABEN EINE LÖNGE VON 80 NM UND EINEN DURCHMESSER VON 40 NM. B) DARSTELLUNG DER ZWEI MÖGLICHEN PLASMONENRESONANZEN IN LONGITUDINALER RICHTUNG (LSPR) UND TRANSVERSALER ORIENTIERUNG (TSPR). C) EXTINKTIONSSPEKTRUM DER GOLD-NANOSTÖBCHEN. D) STREUSPEKTREN EINZELNER NANOSTÖBCHEN. VON BLAU NACH ROT WIRD DIE POLARISATION IN 30°-SCHRITTEN GEÖNDERT.....75
- ABBILDUNG 61: A) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERWENDETEN NANOANTENNE, DIE ÖBER IHRE BIOTIN-MOLEKÖLE AN EINE BSA-BIOTIN-NEUTRAVIDIN-OBERFLÖCHE AUF GLAS GEBUNDEN IST. AN DEM OBEREN AUS SECHS HELICES BESTEHENDEN TEIL SIND ZWEI 60 NM GÖÖE GOLD-NP ANGEBUNDEN. DIE BEIDEN MÖGLICHEN ANBINDE-KONFIGURATIONEN DES „REIÖVERSCHLUSSES“ (R) UND DER „SCHERE“ (S) SIND IN B) UND C) DARGESTELLT. ....76
- ABBILDUNG 62: VON GUILLERMO ACUNA MIT DER KOMMERZIELLEN SOFTWARE CST (FDTD-SIMULATIONEN) ERSTELLTES STREUSPEKTRUM VON 80 NM GOLD-NP (SCHWARZ). ABSORPTIONSSPEKTRUM (ORANGE) UND EMISSIONSSPEKTRUM (ROT) VON ATTO647N [84]. ....77
- ABBILDUNG 63: HISTOGRAMME ÖBER DIE NACH KORREKTUREN EXPERIMENTELL BESTIMMTE STREUWELLENLÖNGE MIT GAUÖ-FIT UND STANDARDABWEICHUNG VON 80 NM SILBER-NP, 60 NM GOLD-NP, 80 NM GOLD-NP UND 100 NM GOLD-NP AN DER NANOANTENNE. ....78
- ABBILDUNG 64: BEISPIEL DER MESSUNG DER NANOANTENNE MIT 60 NM GOLD-NP ALS MONOMER. A) FLUORESZENZBILD, B) DUNKELFELDBILD. IN DEN BILDERN WURDEN DREI MOLEKÖLE BEISPIELHAFT HERAUSGESUCHT: EINE NANOANTENNE OHNE GOLD-NP (1) UND ZWEI NANOANTENNEN MIT EINEM METALLISCHEN GOLD-NP (2 UND 3). C) FLUORESZENZVERSTÖRKUNG IN ABHÖNGIGKEIT VON DER ZEIT FÖR DIE DREI MOLEKÖLE (1: ROT, 2: SCHWARZ, 3: BLAU) UND ENTSPRECHENDE FLUORESZENZABKLINGKURVEN (D) FÖR DIE DREI NANOANTENNEN. E) UND F) POLARISATIONSABHÖNGIGE STREUSPEKTREN DER NANOANTENNEN 2 UND 3. DIE BLAUE LINIE (553 NM  $\pm$  10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE

STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90° .....	79
ABBILDUNG 65: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN MIT EINEM 60 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE (553 NM $\pm$ 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. A-L) MONOMERE, DIE DER ERWARTETEN FORM ENTSPRECHEN. M-R) MONOMERE, DIE VON DER ERWARTETEN FORM ABWEICHEN. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90° UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESCENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE .....	80
ABBILDUNG 66: A-D) ERGEBNISSE DER MESSUNGEN DER NANOANTENNE MIT UNTERSCHIEDLICHEN GOLD-NP-GRÖßEN UND EINEM SILBER-NP, SOWIE DIE REFERENZ OHNE MNP. DIE BOX UMFASST ALLE MOLEKÜLE, DIE SICH INNERHALB DES INTERVALLS VON 25-75% BEFINDEN, WOHINGEGEN DIE GRENZBALKEN NOCH DIE MOLEKÜLE ZWISCHEN 10-90% EINBEZIEHEN. DIE PUNKTE STELLEN DIE MAXIMA UND MINIMA DER PROBE DAR. DIE LINIE INNERHALB DER BOX IST DER MEDIAN. BERECHNUNGEN DER FLUORESCENZLEBENSDAUER (A) UND DER FLUORESCENZVERSTÄRKUNG (B) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER NP-GRÖÖE UNTER ZUHIFFENAHME DES AUFGESTELLTEN MODELLS VON BHARADWAJ ET AL. [55] WERDEN ALS KLEINE QUADRATE DARGESTELLT. ....	82
ABBILDUNG 67: A) ABSORPTIONSSPEKTRUM UND B) STREUSPEKTRUM VON 80 NM SILBER-NP (BLAU) UND 80 NM GOLD-NP (ROT). C-F) BERECHNUNGEN ENTSPRECHEND DER VERÖFFENTLICHUNG VON BHARADWAJ ET AL. [55]. .....	83
ABBILDUNG 68: BEISPIEL DER MESSUNG DER NANOANTENNE MIT 60 NM GOLD-NP ALS DIMER. A) FLUORESCENZBILD, B) DUNKELFELDBILD. IN DEN BILDERN WURDEN DREI MOLEKÜLE BEISPIELHAFT HERAUSGESUCHT: EINE NANOANTENNE MIT EINEM GOLD-NP (1) UND ZWEI NANOANTENNEN MIT ZWEI GOLD-NP (2 UND 3). C) FLUORESCENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT FÜR DIE DREI MOLEKÜLE (1: ROT, 2: SCHWARZ, 3: BLAU) UND ENTSPRECHENDE FLUORESCENZABKLINGKURVEN (D) FÜR DIE DREI NANOANTENNEN. E) UND F) POLARISATIONSABHÄNGIGE STREUSPEKTREN DER NANOANTENNEN 1, 2 UND 3. DIE BLAUE LINIE (553 NM $\pm$ 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE UND DIE ROTE LINIE BEI 578 NM $\pm$ 10 NM DIE MITTLERE ROT-VERSCHIEBUNG DES DIMERS. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90° .....	84
ABBILDUNG 69: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER DIMER-PROBE MIT NUR EINEM 60 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE (553 NM $\pm$ 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90° UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESCENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE .....	85
ABBILDUNG 70: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER DIMER-PROBE MIT ZWEI 60 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE (553 NM $\pm$ 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE UND DIE ROTE LINIE BEI 578 NM $\pm$ 10 NM DIE MITTLERE ROT-VERSCHIEBUNG DES DIMERS. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90° UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESCENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE. ....	86

ABBILDUNG 71: VERGLEICH DER A) FLUORESCENZLEBENSDAUERN UND DER B) FLUORESCENZVERSTÄRKUNG, SOWIE DER C) STREUWELLENLÄNGEN UND DER D) STREUQUERSCHNITTE DES DIMERS MIT DEM MONOMER UND DER REFERENZ FÜR UNTERSCHIEDLICHE MNP. ....	87
ABBILDUNG 72: A) BERECHNETE QUANTENAUSBEUTE UND ELEKTRISCHE FELDVERSTÄRKUNG FÜR EIN DIMER AUS JE 80 NM SILBER UND 80 NM GOLD. B) NUMERISCHE BERECHNUNGEN DES ABSORPTIONSQUERSCHNITTS (B) UND DES STREUQUERSCHNITTS (C) VON DR. G. ACUNA [86].....	89
ABBILDUNG 73: A) TEM-AUFNAHMEN DER VON BBI SOLUTIONS ERWORBENEN GOLD-NP UNTERSCHIEDLICHER GRÖßEN (VON S. CARREGAL ROMERO, [24]). SKALIERUNG: 100 NM. B) HISTOGRAMME ÜBER DIE DURCHMESSER DER GOLD-NP AUS (A). MIT EINEM GAUß-FIT WURDE DIE FWHM UND DER DURSCHNITTLICHE DURCHMESSER ERMITTELT. C) SEM-AUFNAHME DER ULTRAPHÄRISCHEN GOLD-NP MIT EINEM DURCHMESSER VON 74 NM (VON S. SCHLÜCKER, 2017). SKALIERUNG: 100 NM. D) AUFTRAGUNG DES STREUQUERSCHNITTS GEGEN DIE WELLENLÄNGE FÜR DIE 80 NM GOLD-NP VON BBI SOLUTIONS UND DIE 74 NM ULTRASPHÄRISCHEN GOLD-NP VON DER ARBEITSGRUPPE SCHLÜCKER. E) HISTOGRAMME ÜBER DIE WELLENLÄNGE DER 80 NM GOLD-NP VON BBI SOLUTIONS UND DER 74 NM ULTRASPHÄRISCHEN GOLD-NP VON DER ARBEITSGRUPPE S. SCHLÜCKER. ....	90
ABBILDUNG 74: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES WACHSTUMS DER GOLD-NP AN DER NANOANTENNE.....	92
ABBILDUNG 75: A) FLUORESCENZAUFNAHME DER NANOANTENNEN VOR ZUGABE DER GOLDSÄURE/MERCAPTOBERNSTEINSÄURE. B) FLUORESCENZAUFNAHME DER NANOANTENNEN NACH DER ZUGABE. C) FLUORESCENZLEBENSDAUER VOR UND NACH DER ZUGABE DER GOLDSÄURE/MERCAPTOBERNSTEINSÄURE.....	92
ABBILDUNG 76: A) DLS-MESSUNG DES WACHSTUMS DER 40 NM GOLD-NP IN LÖSUNG, B) DUNKELFELDMESSUNG DES WACHSTUMS DER 80 NM GOLD-NP IMMOBILISIERT, C) FLUORESCENZVERSTÄRKUNG UND FLUORESCENZLEBENSDAUER VOR DEM WACHSTUM (ROT) UND DANACH (BLAU) DER 40 NM GOLD-NP UND D) DER 80 NM GOLD-NP. E) AUFTRAGUNG DER STREUWELLENLÄNGE VOR (ROT) UND NACH DEM WACHSTUM (BLAU) DER 40 NM GOLD-NP UND F) DER 80 NM GOLD-NP.....	93
ABBILDUNG 77: A) 3D-DARSTELLUNG DES RO MIT DEN BEIDEN GOLD-NP. B) ELEKTROSTATISCHE ANBINDUNG DER GOLD-NP AN GLAS. C) AFM-BILD DES DIMERS. D) HISTOGRAMME ÜBER DIE QUERSCHNITTE.....	94
ABBILDUNG 78: A) ÄNDERUNG DER ANREGUNGSRATE UND DER QUANTENAUSBEUTE IN ABHÄNGIGKEIT VON DEM ABSTAND ZWISCHEN DEM MNP UND DEM FARBSTOFF FÜR DIE NANOANTENNE (NA) UND DAS RECHTECKIGE DNA-ORIGAMI (RO). B) ÄNDERUNG DER FLUORESCENZLEBENSDAUER UND DER FLUORESCENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM ABSTAND IN ABHÄNGIGKEIT VON DEM ABSTAND ZWISCHEN DEM MNP UND DEM FARBSTOFF FÜR DIE NANOANTENNE (NA) UND DAS RECHTECKIGE DNA-ORIGAMI (RO).....	94
ABBILDUNG 79: VERGLEICH DER A) FLUORESCENZLEBENSDAUERN UND DER B) FLUORESCENZVERSTÄRKUNG, SOWIE DER C) STREUWELLENLÄNGEN UND DER D) STREUQUERSCHNITTE DES DIMERS MIT DEM MONOMER FÜR DAS RO UND DIE NA. E) STREUQUERSCHNITT DES DIMERS BEI EINEM ABSTAND VON 7 NM (RO) UND 12 NM (NA). ....	95
ABBILDUNG 80: A UND B) SCHEMATISCHE DARSTELLUNGEN DER BEIDEN MÖGLICHEN ANORDNUNGEN, IN DENEN DAS RO MIT DEN BEIDEN GOLD-NP ELEKTROSTATISCH AN GLAS ANBINDEN KANN. ....	96
ABBILDUNG 81: A) FLUORESCENZLEBENSDAUER UND B) FLUORESCENZVERSTÄRKUNG DES MONOMER FÜR UNTERSCHIEDLICHE MNP. DIE QUADRATE SIND DIE NACH BHARADWAJ ET AL. [55] BERECHNETEN WERTE. C) SIMULIERTER ABSORPTIONSQUERSCHNITT FÜR DEN MONOMER AUS 60 NM SILBER-NP UND 60 NM GOLD-NP. D)	

SIMULIERTER STREUQUERSCHNITT DES MONOMER FÜR UNTERSCHIEDLICHE MNP. E) STREUWELLENLÄNGE DES MONOMER FÜR UNTERSCHIEDLICHE MNP. F) STREUQUERSCHNITT DES MONOMER FÜR UNTERSCHIEDLICHE MNP.....	97
ABBILDUNG 82: VERGLEICH DER A) FLUORESCENZLEBENSDAUERN UND DER B) FLUORESCENZVERSTÄRKUNG, SOWIE DER C) STREUWELLENLÄNGEN UND DER D) STREUQUERSCHNITTE DES DIMERS MIT DEM MONOMER FÜR UNTERSCHIEDLICHE MNP.....	98
ABBILDUNG 83: A) ABSORPTIONSSPEKTREN VON EINEM DIMER AUS JE ZWEI 60 NM SILBER-NP UND ZWEI 60 NM GOLD-NP. B) STREUSPEKTREN VON EINEM DIMER AUS JE ZWEI 60 NM SILBER-NP UND ZWEI 60 NM GOLD-NP....	99
ABBILDUNG A 1: AUSWERTUNG DER DUNKELFELDSPEKTREN IN DF_WAVELENGTH_ANALYSIS.VI.....	103
ABBILDUNG A 2: AUSWERTUNG DER DUNKELFELDSPEKTREN IN DF_WAVELENGTH_ANALYSIS.VI.....	103
ABBILDUNG A 3: AUSWERTUNG MEHRERER AUFNAHMEN EINER OBERFLÄCHE IN DF_WAVELENGTH_ANALYSIS_OVERLAY.VI. EINLADEN DER KOORDINATEN UND DES ZUGEHÖRIGEN BILDES.....	104
ABBILDUNG A 4: AUSWERTUNG MEHRERER AUFNAHMEN EINER OBERFLÄCHE IN DF_WAVELENGTH_ANALYSIS_OVERLAY.VI. EINLADEN DES BILDES, DESSEN SPEKTREN BESTIMMT WERDEN SOLLEN UND ÜBEREINANDER LEGEN DER BEIDEN BILDER.....	104
ABBILDUNG A 5: AUSWERTUNG DER KOMBINIERTEN DUNKELFELD- UND KONFOKALEN MESSUNG IN DF_CF_ANALYSIS.VI. EINLADEN DES DUNKELFELD- UND KONFOKALEN BILDES.....	105
ABBILDUNG A 6: AUSWERTUNG DER KOMBINIERTEN DUNKELFELD- UND KONFOKALEN MESSUNG IN DF_CF_ANALYSIS.VI. ÜBEREINANDERLEGEN DER BEIDEN BILDER.....	105
ABBILDUNG A 7: AUSWERTUNG DER KOMBINIERTEN DUNKELFELD- UND KONFOKALEN MESSUNG IN DF_CF_ANALYSIS.VI. NUMMERIEREN DES KONFOKALEN BILDES.....	106
ABBILDUNG A 8: AUSWERTUNG DER KOMBINIERTEN DUNKELFELD- UND KONFOKALEN MESSUNG IN DF_CF_ANALYSIS.VI. SUCHEN DER SPOTS IM DUNKELFELD-BILD.....	106
ABBILDUNG A 9: AUSWERTUNG DER MODULIERTEN SPUREN IN FIFOSCREENBURST.VI MIT FOURIER-TRANSFORMATION UND SINUS-FIT.....	107
ABBILDUNG A 10 SPEKTRUM DES WEIßLICHTLASERS .....	107
ABBILDUNG A 11 SPEKTRUM DER DUNKELFELDLAMPE .....	108
ABBILDUNG A 12: AGAROSE-GEL DES RECHTECKIGEN DNA-ORIGAMI.....	115
ABBILDUNG A 13: A) TEM-AUFNAHMEN DER KRAFTKLAMMER BEI EINER KRAFT VON 0 PN, 6 PN UND 12 PN. B) AGAROSE-GEL DER IN DER KRAFTKLAMMER VERANKERTEN HOLLIDAY JUNCTION FÜR DIE KRÄFTE VON 0 PN BIS 4 PN. C) AGAROSE GEL DER FÜR DAS TBP MODIFIZIERTEN KRAFTKLAMMER FÜR DIE KRÄFTE VON 0 PN BIS 11,4 PN. L IST DIE DNA-LEITER UND S DER GERÜSTSTRANG [11].....	116
ABBILDUNG A 14: GAMMA-KORREKTUR DER 0 PN PROBE MIT DER HOLLIDAY JUNCTION. A) ANPASSEN EINES FITS AN DIE PUNKTWOLKEN DER BEIDEN FRET-POPULATIONEN. B, D) HISTOGRAMME ÜBER DIE FRET-EFFIZIENZ VOR (B) UND NACH DER KORREKTUR (D). C, E) HISTOGRAMME ÜBER DIE STÖCHIOMETRIE VOR (C) UND NACH DER GAMMA-KORREKTUR (E).....	116

ABBILDUNG A 15: VERWEILZEIT DER MOLEKÜLE IM ISO-I BZW. ISO-II ZUSTAND FÜR DIE EINZELNE HOLLIDAY JUNCTION UND DIE HOLLIDAY JUNCTION INNERHALB DER KRAFTKLAMMER BEI UNTERSCHIEDLICHEN ANGELEGTE KRAFTEN. ....	116
ABBILDUNG A 16: LOGARITHMISCHE AUFTRAGUNG DER ÜBERGANGSRATEN VOM ISO-II IN DEN ISO-I ZUSTAND GEGEN DIE ÜBERGANGSRATEN VOM ISO-I IN DEN ISO-II ZUSTAND FÜR JEDE EINZELNE SPUR ALLER HOLLIDAY JUNCTIONS. ....	117
ABBILDUNG A 17: GAMMA-KORREKTUR DER 0 PN PROBE MIT TBP. A) ANPASSEN EINES FITS AN DIE PUNKTWOLKEN DER BEIDEN FRET-POPULATIONEN. B, D) HISTOGRAMME ÜBER DIE FRET-EFFIZIENZ VOR (B) UND NACH DER KORREKTUR (D). C, E) HISTOGRAMME ÜBER DIE STÖCHIOMETRIE VOR (C) UND NACH DER GAMMA-KORREKTUR (E).....	117
ABBILDUNG A 18: STÖCHIOMETRIE-FRET-EFFIZIENZ-PLOTS FÜR DIE PROBEN OHNE TBP (A) UND MIT TBP (B) BEI UNTERSCHIEDLICHEN KRAFTEN. ....	117
ABBILDUNG A 19: DARSTELLUNG ALLER MÖGLICHEN KOMBINATIONEN ZWISCHEN EINEM BIS SECHS DONORMOLEKÜLEN ZU EINEM AKZEPTORMOLEKÜL [17]. EINGERAHM T SIND DIE MIT EINZELMOLEKÜL-FLUORESZENZMIKROSKOPIE GEMESSENEN PROBEN.....	118
ABBILDUNG A 20: A) ÜBER ALLE MÖGLICHEN KOMBINATIONEN GEMITTELTER ANTENNENEFFEKT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ANZAHL AN DONORMOLEKÜLEN MIT LINEAREM FIT. B) ANTENNENEFFEKT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION AN MAGNESIUM-IONEN. C) NORMALISIERTE FLUORESZENZINTENSITÄT DES SYNTHETISCHEN LICHTSAMMELKOMPLEXES MIT EINEM AKZEPTOR INNERHALB (A1, ROT) UND AUßERHALB DES RINGS (A2, SCHWARZ). DIE ABBILDUNG WURDE VERÄNDERT NACH [17].....	118
ABBILDUNG A 21: A) SKIZZEN ALLER GEMESSENEN KONFIGURATIONEN DER DONORMOLEKÜLE ZUM AKZEPTORMOLEKÜL AUF DEM DNA-ORIGAMI. B) GEMESSENER ANTENNENEFFEKT FÜR DIE PROBEN AUS (A). C) GEMESSENE STÖCHIOMETRIE DER PROBEN AUS (A). D) GEMESSENE FRET-EFFIZIENZEN DER PROBEN AUS (A). C) UND D) SIND GAMMA-KORRIGIERTE WERTE.....	119
ABBILDUNG A 22: BEISPIEL DER MESSUNG DER NANOANTENNE MIT 80 NM GOLD-NP ALS MONOMER. A) FLUORESZENZBILD, D) DUNKELFELDBILD. IN DEN BILDERN WURDEN DREI MOLEKÜLE BEISPIELHAFT HERAUSGESUCHT: EINE NANOANTENNE OHNE GOLD-NP (1) UND ZWEI NANOANTENNEN MIT EINEM METALLISCHEN GOLD-NP (2 UND 3). B) FLUORESZENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT FÜR DIE DREI MOLEKÜLE (1: ROT, 2: SCHWARZ, 3: BLAU) UND ENTSPRECHENDE FLUORESZENZABKLINGKURVEN (C) FÜR DIE DREI NANOANTENNEN. E) UND F) POLARISATIONSABHÄNGIGE STREUSPEKTREN DER NANOANTENNEN 2 UND 3. DIE BLAUE LINIE (557 NM $\pm$ 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90°. ....	121
ABBILDUNG A 23: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN MIT EINEM 80 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE (557 NM $\pm$ 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. A) MONOMERE, DIE DER ERWARTETEN FORM ENTSPRECHEN. B) MONOMERE, DIE VON DER ERWARTETEN FORM ABWEICHEN. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90° UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE.....	122

- ABBILDUNG A 24: BEISPIEL DER MESSUNG DER NANOANTENNE MIT 80 NM SILBER-NP ALS MONOMER. A) FLUORESZENZBILD, D) DUNKELFELDBILD. IN DEN BILDERN WURDEN DREI MOLEKÜLE BEISPIELHAFT HERAUSGESUCHT: EINE NANOANTENNE OHNE SILBER-NP (1) UND ZWEI NANOANTENNEN MIT EINEM METALLISCHEN GOLD-NP (2 UND 3). B) FLUORESZENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT FÜR DIE DREI MOLEKÜLE (1: ROT, 2: SCHWARZ, 3: BLAU) UND ENTSPRECHENDE FLUORESZENZABKLINGKURVEN (C) FÜR DIE DREI NANOANTENNEN. E) UND F) POLARISATIONSABHÄNGIGE STREUSPEKTREN DER NANOANTENNEN 2 UND 3. DIE BLAUE LINIE ( $460 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU:  $0^\circ$ , GRÜN:  $30^\circ$ , ROT:  $60^\circ$ , ORANGE:  $90^\circ$ . ..... 122
- ABBILDUNG A 25: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN MIT EINEM 80 NM SILBER-NP. DIE BLAUE LINIE ( $460 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. A) MONOMERE, DIE DER ERWARTETEN FORM ENTSPRECHEN. B) MONOMERE, DIE VON DER ERWARTETEN FORM ABWEICHEN. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU:  $0^\circ$ , GRÜN:  $30^\circ$ , ROT:  $60^\circ$ , ORANGE:  $90^\circ$  UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE..... 123
- ABBILDUNG A 26: BEISPIEL DER MESSUNG DER NANOANTENNE MIT 100 NM GOLD-NP ALS MONOMER. A) FLUORESZENZBILD, D) DUNKELFELDBILD. IN DEN BILDERN WURDEN DREI MOLEKÜLE BEISPIELHAFT HERAUSGESUCHT: EINE NANOANTENNE OHNE GOLD-NP (1) UND ZWEI NANOANTENNEN MIT EINEM METALLISCHEN GOLD-NP (2 UND 3). B) FLUORESZENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT FÜR DIE DREI MOLEKÜLE (1: ROT, 2: SCHWARZ, 3: BLAU) UND ENTSPRECHENDE FLUORESZENZABKLINGKURVEN (C) FÜR DIE DREI NANOANTENNEN. E) UND F) POLARISATIONSABHÄNGIGE STREUSPEKTREN DER NANOANTENNEN 2 UND 3. DIE BLAUE LINIE ( $573 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU:  $0^\circ$ , GRÜN:  $30^\circ$ , ROT:  $60^\circ$ , ORANGE:  $90^\circ$ . ..... 124
- ABBILDUNG A 27: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN MIT EINEM 100 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE ( $573 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. A) MONOMERE, DIE DER ERWARTETEN FORM ENTSPRECHEN. B) MONOMERE, DIE VON DER ERWARTETEN FORM ABWEICHEN. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU:  $0^\circ$ , GRÜN:  $30^\circ$ , ROT:  $60^\circ$ , ORANGE:  $90^\circ$  UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE..... 124
- ABBILDUNG A 28: BEISPIEL DER MESSUNG DER NANOANTENNE MIT 80 NM SILBER-NP ALS DIMER. A) FLUORESZENZBILD, D) DUNKELFELDBILD. IN DEN BILDERN WURDEN DREI MOLEKÜLE BEISPIELHAFT HERAUSGESUCHT: EINE NANOANTENNE MIT EINEM SILBER-NP (1) UND ZWEI NANOANTENNEN MIT ZWEI SILBER-NP (2 UND 3). B) FLUORESZENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT FÜR DIE DREI MOLEKÜLE (1: ROT, 2: SCHWARZ, 3: BLAU) UND ENTSPRECHENDE FLUORESZENZABKLINGKURVEN (C) FÜR DIE DREI NANOANTENNEN. E), F) UND G) POLARISATIONSABHÄNGIGE STREUSPEKTREN DER NANOANTENNEN 1, 2 UND 3. DIE BLAUE LINIE ( $460 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE UND DIE ROTE LINIE BEI  $482 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  DIE MITTLERE ROT-VERSCHIEBUNG DES DIMERS. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN

REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90°.....	125
ABBILDUNG A 29: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER DIMER-PROBE MIT NUR EINEM 80 NM SILBER-NP. DIE BLAUE LINIE (460 NM ± 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90°.....	
	125
ABBILDUNG A 30: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER DIMER-PROBE MIT ZWEI 80 NM SILBER-NP. DIE BLAUE LINIE (460 NM ± 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE UND DIE ROTE LINIE BEI 482 NM ± 10 NM DIE MITTLERE ROT-VERSCHIEBUNG DES DIMERS. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90°.....	
	126
ABBILDUNG A 31: BEISPIEL DER MESSUNG DER NANOANTENNE MIT 100 NM GOLD-NP ALS DIMER. A) FLUORESCENZBILD, D) DUNKELFELDBILD. IN DEN BILDERN WURDEN DREI MOLEKÜLE BEISPIELHAFT HERAUSGESUCHT: EINE NANOANTENNE MIT EINEM GOLD-NP (1) UND ZWEI NANOANTENNEN MIT ZWEI GOLD-NP (2 UND 2). B) FLUORESCENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT FÜR DIE DREI MOLEKÜLE (1: ROT, 2: SCHWARZ, 3: BLAU) UND ENTSPRECHENDE FLUORESCENZABKLINGKURVEN (C) FÜR DIE DREI NANOANTENNEN. E), F) UND G) POLARISATIONSABHÄNGIGE STREUSPEKTREN DER NANOANTENNEN 1, 2 UND 3. DIE BLAUE LINIE (573 NM ± 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE UND DIE ROTE LINIE BEI 635 NM ± 10 NM DIE MITTLERE ROT-VERSCHIEBUNG DES DIMERS. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90°.....	
	126
ABBILDUNG A 32: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER DIMER-PROBE MIT NUR EINEM 100 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE (573 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90° UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESCENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE.....	
	127
ABBILDUNG A 33: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER DIMER-PROBE MIT ZWEI 100 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE (573 NM ± 10 NM) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE UND DIE ROTE LINIE BEI 635 NM ± 10 NM DIE MITTLERE ROT-VERSCHIEBUNG DES DIMERS. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: 0°, GRÜN: 30°, ROT: 60°, ORANGE: 90° UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESCENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE.....	
	127
ABBILDUNG A 34: FLUORESCENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER FLUORESCENZLEBENSDAUER FÜR DIE NA MIT A) 60 NM GOLD-NP, B) 80 NM SILBER-NP, C) 100 NM GOLD-NP ALS MONOMER UND DIMER. DIE BOX UMFASST ALLE MOLEKÜLE, DIE SICH INNERHALB DES INTERVALLS VON 25-75% BEFINDEN, WOHINGEGEN DIE GRENZBALKEN NOCH DIE MOLEKÜLE ZWISCHEN 10-90% EINBEZIEHT. DIE PUNKTE STELLEN DIE MAXIMA UND MINIMA DER PROBE DAR. DIE LINIE INNERHALB DER BOX IST DER MEDIAN. ....	
	128
ABBILDUNG A 35: FLUORESCENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER FLUORESCENZLEBENSDAUER FÜR A) DIE NA MIT 60 NM GOLD-NP UND B) DAS RO MIT 60 NM GOLD-NP ALS MONOMER UND DIMER. DIE BOX UMFASST ALLE	

MOLEKÜLE, DIE SICH INNERHALB DES INTERVALLS VON 25-75% BEFINDEN, WOHINGEGEN DIE GRENZBALKEN NOCH DIE MOLEKÜLE ZWISCHEN 10-90% EINBEZIEHT. DIE PUNKTE STELLEN DIE MAXIMA UND MINIMA DER PROBE DAR. DIE LINIE INNERHALB DER BOX IST DER MEDIAN.....	131
ABBILDUNG A 36: ÄNDERUNG DER ANREGUNGSRATE (BLAU) UND DER QUANTENAUSBEUTE (ROT) IN ABHÄNGIGKEIT VOM MNP.....	131
ABBILDUNG A 37: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER NRO-PROBE MIT NUR EINEM 40 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE ( $546 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: $0^\circ$ , GRÜN: $30^\circ$ , ROT: $60^\circ$ , ORANGE: $90^\circ$ UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE.....	131
ABBILDUNG A 38: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER NRO-PROBE MIT NUR EINEM 60 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE ( $553 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: $0^\circ$ , GRÜN: $30^\circ$ , ROT: $60^\circ$ , ORANGE: $90^\circ$ UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE.....	132
ABBILDUNG A 39: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER NRO-PROBE MIT NUR EINEM 60 NM SILBER-NP. DIE BLAUE LINIE ( $455 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: $0^\circ$ , GRÜN: $30^\circ$ , ROT: $60^\circ$ , ORANGE: $90^\circ$ UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE.....	132
ABBILDUNG A 40: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER NRO-PROBE MIT ZWEI 40 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE ( $546 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE UND DIE ROTE LINIE BEI $555 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ DIE MITTLERE ROT-VERSCHIEBUNG DES DIMERS. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: $0^\circ$ , GRÜN: $30^\circ$ , ROT: $60^\circ$ , ORANGE: $90^\circ$ UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE.....	132
ABBILDUNG A 41: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER NRO-PROBE MIT ZWEI 60 NM GOLD-NP. DIE BLAUE LINIE ( $553 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE UND DIE ROTE LINIE BEI $566 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ DIE MITTLERE ROT-VERSCHIEBUNG DES DIMERS. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: $0^\circ$ , GRÜN: $30^\circ$ , ROT: $60^\circ$ , ORANGE: $90^\circ$ UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE.....	133
ABBILDUNG A 42: AUSGEWÄHLTE STREUSPEKTREN DER NANONANTENNEN DER NRO-PROBE MIT ZWEI 60 NM SILBER-NP. DIE BLAUE LINIE ( $455 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) IST DIE AUS ABBILDUNG 63 ERMITTELTE MITTLERE STREUWELLENLÄNGE UND DIE ROTE LINIE BEI $486 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ DIE MITTLERE ROT-VERSCHIEBUNG DES DIMERS. DIE FARBEN DER STREUSPEKTREN REPRÄSENTIEREN DIE UNTERSCHIEDLICHEN EINSTELLUNGEN DES LINEARPOLARISATORS: BLAU: $0^\circ$ , GRÜN: $30^\circ$ , ROT: $60^\circ$ , ORANGE: $90^\circ$ UND DIE ZAHLEN IN DEN GRAPHEN SIND DIE FLUORESZENZVERSTÄRKUNG FÜR DIE JEWEILIGE NANOANTENNE.....	133



ABBILDUNG A 43: FLUORESZENZVERSTÄRKUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER FLUORESZENZLEBENSDAUER FÜR DAS RO  
MIT A) 40 NM GOLD-NP, B) 60 NM GOLD-NP, C) 60 NM SILBER-NP ALS MONOMER UND DIMER. DIE BOX  
UMFASST ALLE MOLEKÜLE, DIE SICH INNERHALB DES INTERVALLS VON 25-75% BEFINDEN, WOHINGEGEN DIE  
GRENZBALKEN NOCH DIE MOLEKÜLE ZWISCHEN 10-90% EINBEZIEHT. DIE PUNKTE STELLEN DIE MAXIMA UND  
MINIMA DER PROBE DAR. DIE LINIE INNERHALB DER BOX IST DER MEDIAN. .... 134

## 10. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ZU VERWENDENDEN VOLUMEN AN DNA-STRÄNGEN [100 $\mu$ M] FÜR DIE MNP-FUNKTIONALISIERUNG.....	55
TABELLE 2: AUSSALZUNGSTABELLE.....	55
TABELLE 3: DIELEKTRISCHE LEITFÄHIGKEIT VON GOLD UND SILBER IN ABHÄNGIGKEIT VON DER WELLENLÄNGE AUS [47, 91]. .....	120
TABELLE 4: MONOMERE KORRELATION.....	129
TABELLE 5: DIMERE KORRELATION .....	130

## 11. Liste aller Publikationen

Holzmeister, P., **Wünsch, B.**, Gietl, A., Tinnefeld, P. (2014) Single-molecule photophysics of dark quenchers as non-fluorescent FRET acceptors. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **13** (6), 853–858.

Schmied, J.J., Raab, M., Forthmann, C., Pibiri, E., **Wünsch, B.**, Dammeyer, T., Tinnefeld, P. (2014) DNA origami–based standards for quantitative fluorescence microscopy. *Nat. Protocols*, **9** (6), 1367–1391.

Puchkova, A., Vietz, C., Pibiri, E., **Wünsch, B.**, Sanz Paz, M., Acuna, G.P., Tinnefeld, P. (2015) DNA Origami Nanoantennas with over 5000-fold Fluorescence Enhancement and Single-Molecule Detection at 25  $\mu$ M. *Nano Lett.*, **15** (12), 8354–8359.

Hemmig, E. A., Creatore, C., **Wünsch, B.**, Hecker, L., Mair, P., Parker, M. A., Emmott, S., Tinnefeld, P., Keyser, U.F., Chin, A.W. (2016) Programming light-harvesting efficiency using DNA origami. *Nano Letters*, **16** (4), 2369–2374.

Liu, W., Naydenov, B., Chakraborty, S., **Wünsch, B.**, Hübner, K., Ritz, S., Cölfen, H., Barth, H., Koynov, K., Qi, H., Leiter, R., Reuter, R., Wrachtrup, J., Boldt, F., Scheuer, J., Kaiser, U., Sison, M., Lasser, T., Tinnefeld, P., Jelezko, F., Walther, P., Wu, Y., Weil, T. (2016) Fluorescent Nanodiamond-Gold Hybrid Particles for Multimodal Optical and Electron Microscopy Cellular Imaging. *Nano Letters*, **16** (10), 6236–6244.

Nickels, P.C., **Wünsch, B.**, Holzmeister, P., Bae, W., Kneer, L.M., Grohmann, D., Tinnefeld, P., Liedl, T. (2016) Molecular force spectroscopy with a DNA origami–based nanoscopic force clamp. *Science*, **354** (6310), 305.

**Wünsch, B.**, Nickels, P., Schröder, T., Grohmann, S., Liedl, T., Tinnefeld, P. (2017) Molekulare Kraftklammer: Kraftspektroskopie leicht gemacht. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, **61** (1), 28–31.

Hashemi, P., Luckau, L., Mischnick, P., Schmidt, S., Stosch, R., **Wünsch, B.** (2017) Biomacromolecules as tools and objects in nanometrology—current challenges and perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0554-9>

## 12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben:

Prof. Philip Tinnefeld für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe in vielfältigen und zuweilen äußerst anfordernden Gebieten zu arbeiten und an interessanten Kooperationen und Konferenzen teilzunehmen, sowie für das in mich gesetzte Vertrauen.

Dr. Christof Maul und Prof. Petra Mischnick für das Lesen dieser Arbeit und die Mitarbeit im Prüfungskomitee.

Dr. Guillermo Acuna für die Einführung in das Gebiet der Nanoplasmonik und der Simulationen mit CST.

Dr. Carsten Forthmann und Tim Schröder für das kritische Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Dr. Carsten Forthmann für den äußerst wichtigen (!) LabVIEW-Kurs und die Hilfe bei jeglichen Problemen bezüglich des Programmierens in LabVIEW.

Tim Schröder, dafür, dass ich ihn jederzeit mit Fragen nerven konnte und für die vielen hilfreichen Diskussionen.

Kristina Hübner für die Hilfe beim Auf- und Abbau des Setups und die Zusammenarbeit an den Nanodiamanten und der Lösungssynthese.

Ija Jusuk für die stets lustige Zeit im Büro mit vielen Gesprächen und Diskussionen (nicht nur über die Arbeit). Schön, dass man mit dir jederzeit über alles reden konnte. :)

Dr. Andreas Gietl für die Hilfe bei den Weitfeldmessungen, der Analyse von FRET-Spuren mit HaMMY und die vielen Male in denen du mich motivieren konntest weiter zu machen. Ich werde dich nicht vergessen!

Die 108er Gruppe (Enrico, Kristina, Johann, Julia L., Rainer und kurze Zeit auch Lisa) für die angenehme Atmosphäre und die netten Kaffee-Pausen. :)

Das Büro 228 (Kathi, Kristina, Sarah O.) für das vergnügliche und freundschaftliche Arbeitsklima (mit gelegentlichen Besuchen von anderen Büros). :)

Philipp Nickels für die angenehme Zusammenarbeit an der molekularen Kraftklammer.

Dr. Phil Holzmeister, der mir mit viel Geduld alles über konfokale Fluoreszenzmikroskopie, Optik, Aufbau eines Mikroskops inklusive Datenanalyse und Datenauswertung, Photophysik von Farbstoffmolekülen, Förster-Resonanz-Energie-Transfer und alles, was für die erfolgreiche Arbeit in einem Laserlabor notwendig ist, beibrachte. Er war jederzeit für mich da, wenn ich seine Hilfe brauchte und konnte mir durch sein umfassendes Wissen in allen Fragestellungen weiterhelfen. Danke für dein Vertrauen und dass du mir das Projekt „molekulare Kraftklammer“ anvertraut hast. Ohne deine Hilfe bei der Erweiterung des konfokalen Fluoreszenzmikroskops um das Dunkelfeldmikroskop und gerade bei der Implementierung einer logischen und schnellen Datenanalyse wäre ich nicht so weit gekommen. Danke!

Bea, Ben, Julia M., Judith, Luise, Philipp, Sarah und allen anderen Mitgliedern von NanoMet und IGSM mit denen Wissenschaft (und Freizeit) um einiges lustiger wurde.

Besonders die GNTM-, Outlander-, Koch-, Disney- und Spiele-Abende mit Andi, Nastija, Caro, Carsten, Ija, Julia L., Julia M., Kathi, Kristina, Johann, Mario, Rainer und Simeon haben die Zeit positiv beeinflusst. :)

Leo, Ben, Caro D., Katha und Susi dafür, dass sie jederzeit Verständnis hatten, wenn ich länger im Labor stand.

Frau Talk, die als Sekretärin jederzeit einen guten Job machte und uns immer freundlich unterstützt hat.

Und allen weiteren gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die die Arbeit angenehm gemacht haben (Adrian, Alex, Anastasiya, Andres, Angela, Birka, Dina, Friederike, Kateryna, Kevin, Izabela, Jessica, Jürgen, Marita, Max, Peter, Sabine, Sofiene, Susanne, Thorben).

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für die andauernde Unterstützung in den letzten 28 Jahren.

## 13. Curriculum Vitae

### Bettina Wünsch

<b>Persönliche Daten</b>	Geboren am 16.06.1989 in Goslar, Deutschland
<b>Adresse</b>	Mozartstraße 65, 38106 Braunschweig <a href="mailto:bwuensch@freenet.de">bwuensch@freenet.de</a>
<b>Akademische Laufbahn</b>	
10/2013 – heute	Promotionsstudium, Chemie Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, TU Braunschweig, Deutschland
10/2011 – 09/2013	Masterstudium, Chemie TU Braunschweig, Deutschland
10/2008 – 09/2011	Bachelorstudium, Chemie TU Braunschweig, Deutschland
<b>Arbeitserfahrung</b>	
01/2013 – heute	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, TU Braunschweig, Deutschland